UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ NÁLOŽE V INFEKČNÍ RÁNĚ

diplomová práce

Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Dršata CSc.

Externí konzultant: MUDr. Jana Matonohová DiS.

Hradec Králové, 2015

Bc. Tereza Foglová

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu."

V Hradci Králové dne …… …….

Tereza Foglová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především Mgr. Vojtěchovi Pavlíkovi, MUDr. Janě Matonohové, DiS. a prof. MUDr. Jaroslavovi Držatovi CSc. za jejich ochotu, trpělivost, cenné rady a významnou pomoc při vytváření této diplomové práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Tereza Foglová
Školitel: prof. MUDr. Jaroslav Dršata CSc.
Externí konzultant: MUDr. Jana Matonohová DiS.
Název diplomové práce: **Stanovení mikrobiální nálože v infekční ráně**

Výskyt chronických ran stoupá s přibývajícím věkem. Nejčastějším typem chronické rány jsou chronické vředy na nohou, jimiž trpí 1 – 2 % populace v rozvinutých zemí. *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* představují nejčastější agens izolované z chronických ran. Jejich vysoká rezistence k antibiotikům a schopnost tvořit biofilm výrazně prodlužuje hojení, v některých případech jej zcela znemožňuje.

V této práci jsme porovnávali metodu stanovení bakteriálního počtu výsevem a kultivací s real-time PCR. Stanovovali jsme druh *Pseudomonas aeruginosa* ve vzorku prasečí rány infikované *in vitro* předpěstovaným vícedruhovým biofilmem. V průběhu hojení infikovaných ran jsme odebírali tkáňové biopsie, ze kterých byla určována kultivačně CFU (colony forming unit) a zároveň byla provedena kvantifikace pomocí real-time PCR.

Z výsledků kultivace byl zřetelný trend poklesu počtu bakterií v průběhu hojení rány. U real-time PCR nebyl pokles tak zřetelný.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Tereza Foglová
Supervisor: prof. MUDr. Jaroslav Dršata CSc.
External consultant: MUDr. Jana Matonohová DiS.
Title of diploma thesis: **Assessment of microbial load in the infection wound**

The incidence of chronic wounds rises with age. The most common type of chronic wounds are chronic leg ulcers, which affect 1 – 2 % of the population in the developed countries. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are the most common agens isolated from chronic wounds. Their high antimicrobial resistance and ability to form biofilm considerably prolong wound healing, in some cases make it impossible.

In this study, we compared the cultivation with real-time PCR. We used the species *Pseudomonas aeruginosa* for comparison. *Pseudomonas aeruginosa* was isolated from biofilm, which was a part of artificial wound. We collected tissue biopsies during wound healing. We determined CFU by cultivation and quantification real-time PCR.

The results of cultivation was clear downward trend in the number of bacteria in wound healing. Decline was not as pronounced for real-time PCR.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 7
1. ÚVOD 8
2. TEORETICKÁ ČÁST 9
2.1. Hojení ran 9
2.1.1. Hojení akutní rány 10
2.1.2. Hojení chronické rány 11
2.2. Bakteriální biofilm 12
2.2.1. Bakteriální biofilm a antibiotika 13
2.3. Nejčastější patogeny v chronické ráně 14
2.3.1. Staphylococcus aureus 14
2.3.2. Pseudomonas aeruginosa 15
2.4. Mikrobiologické vyšetřovací metody 17
2.4.1. Mikroskopie 18
2.4.2 Kultivace 19
2.4.3. Biochemické testy 20
2.4.4. Průkaz antigenní struktury 20
2.5. Detekce DNA 22
2.5.1. PCR 23
2.5.2. Real-time PCR 24
3. CÍL PRÁCE 29
4. MATERIÁL A METODIKA 30
4.1. Materiál a chemikálie 30
4.2. Pomůcky a přístroje 31
4.3. Metodické postupy 31
4.3.1. Příprava homogenátu z biopsie rány prasete 31
4.3.2. Kultivace 32
4.3.3. Izolace DNA 33
4.3.4. PCR 34
4.3.5. Příprava kalibrační křivky 35
5. VÝSLEDKY 38
5.2. Odečet kultivace na živném agaru 38
5.3. Vyhodnocení real-time PCR 45
6. DISKUZE 52

7. ZÁVĚR 54
Seznam použité literatury: 55

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CFU – colony forming unit

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

EGF – epidermální růstový faktor

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FGF – fibroblastový růstový faktor

FRET – fluorescence resonance energy transfer

McF - McFarland

MMP – matrix metaloproteináza

MRSA – methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*

OD – optická hustota

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDGF – destičkový růstový faktor

PMN – polymorfonukleární neutrofil

RIA - radioimunoanalýza

RNA – ribonukleová kyselina

TGF – transformující růstový faktor

TIMP – inhibitor tkáňových metaloproteináz

TSA – trypton sójový agar

TSB – trypton sójový bujón

1. ÚVOD

Nárůst počtu obézních lidí následovaný diabetem a kardiovaskulárními chorobami přispívá k rozvoji chronických ran kolonizovaných bakteriemi. Výskyt chronických ran stoupá s přibývajícím věkem. Nejčastějším typem chronické rány jsou chronické vředy na nohou, jimiž trpí 1 – 2 % populace v rozvinutých zemích. Jsou hlavní příčinou prodloužené nemocnosti s častými zpožděními hojení a vysokou mírou recidivy. *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* představují nejčastější agens izolované z chronických ran. Jejich vysoká rezistence k antibiotikům a schopnost tvořit biofilm výrazně prodlužují hojení, v některých případech zcela znemožňují. Pro správnou léčbu se musí brát v potaz více faktorů, jako jsou proces stárnutí kůže, faktory související se zdravotním stavem pacienta a faktory týkající se konkrétní rány.

Pro adekvátní léčbu je důležité stanovit mikrobiální zatížení rány. Nejčastější metodou pro stanovení mikrobiální nálože v chronické ráně je kultivace. Stanovení bakteriálního počtu pomocí real-time PCR proti specifické bakteriální DNA je však používanou alternativou ke kultivaci. (Bjarnsholt 2008, Matějková 2009, Serra 2015) V této práci porovnáváme stanovení bakteriální nálože experimentálních infikovaných ran kultivačně a pomocí real-time PCR a hodnotíme výhody a nevýhody obou metod.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Hojení ran

Kožní rána je ztráta nebo porucha kožního krytu, která je vyvolána různými mechanismy. Nejčastější příčiny vzniku rány jsou příčiny mechanické (řezné, tržné, atd.), chemické (louhy, kyseliny), termické (omrzliny, popáleniny) a aktinické (radiační záření). Podle délky hojení rozdělujeme rány na akutní a chronické. Akutní rána je primárně se hojící rána, která vzniká ve zdravé tkáni. Rána se hojí v krátkém čase, obvykle do 6 týdnů. (Janíková a Zeleníková 2013, Pejznochová 2010)

Chronická rána je rána, která se nehojí více než 6-9 týdnů. Mezi příčiny vzniku chronických ran patří změněné tkáně v důsledku špatného prokrvení nejčastěji žilního, ale i tepenného původu, lokálního působení tlaku nebo záření, nedostatečného prokrvení kůže, systémových onemocnění. Vznikají bércové vředy, arteriální kožní vředy, proleženiny, neuropatické kožní vředy. (Pejznochová 2010)

V současné literatuře se vyskytuje termín nehojící se rána, který nahrazuje pojem chronická rána a zohledňuje další faktory, které mají vliv na proces hojení, jako jsou stav rány, její příčina a prognóza. Tyto rány vznikají přechodem akutní rány do chronicity, mikrotraumatizací tkáně, nebo je příčinou základní onemocnění, které zapříčiňuje prohloubení nekrózy tkání. (Jeníková a Zeleníková 2013)

V dnešní době vzhledem k vyššímu výskytu různých predispozicí, kterými jsou sedavý způsob života, nutriční poruchy, vyšší věk, kterého se lidé dožívají, infekce v ráně a přítomnost biofilmu v ní, se výskyt chronických ran zvyšuje. Nehojící se rány představují významné faktory, které vyžadují časté hospitalizace a drahé léčby stejně jako jejich těžké komplikace, jako jsou sepse, malignity nebo ztráta končetiny. (Mihai a kol. 2014)

Hojení ran je dynamický přirozený proces, který se zahájí okamžitě po vzniku rány. Hojení se skládá z 3 fází: exsudativní fáze, proliferační fáze a fáze remodelace, které na sebe navazují nebo se vzájemně překrývají. Každá fáze by měla probíhat regulovaným způsobem. (Guo a Dipietro 2010)

2.1.1. Hojení akutní rány

První exsudativní fáze začíná bezprostředně po zranění a trvá obvykle 3 dny. Tato fáze začíná cévním zúžením a tvorbou fibrinové sraženiny. Z této sraženiny a okolní tkáně rány jsou uvolňovány prozánětlivé cytokiny a růstové faktory, jako jsou transformující růstový faktor β (TGF-β), destičkový růstový faktor (PDGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a epidermální růstový faktor (EGF). Jakmile je krvácení pod kontrolou, jsou působením chemotaxe aktivovány zánětlivé buňky, které do rány migrují a podporují zde zánětlivou fázi, která je charakteristická infiltrací neutrofily, makrofágy a lymfocyty. (Guo a Dipietro 2010; Jeníková a Zeleníková 2013)

Funkcí neutrofilů je odstranění mikrobů a buněčného debris z poraněné oblasti. Makrofágy zpočátku uvolňují cytokiny, které podporují zánětlivou reakci a aktivaci dalších leukocytů. Makrofágy jsou také zodpovědné za indukci a odstranění apoptotických buněk. Přechod do proliferační fáze makrofágy podporují tím, že po odstranění apoptotických buněk svým fenotypovým přechodem stimulují keratinocyty, fibroblasty a buňky cévního endotelu, a tak podporují regeneraci tkáně. T- lymfocyty se do rány dostávají po zánětlivých buňkách a makrofázích. Opožděné infiltrace T-lymfocytů spolu s jejich sníženou koncentrací jsou spojeny s poruchou hojení rány. Park a Barbul (2004) uvádějí, že CD4+ buňky (T_h-lymfocyty) mají pozitivní roli v hojení, kdežto CD8+ buňky (cytotoxické T-lymfocyty) mají inhibiční úlohu při hojení ran. (Guo a Dipietro 2010, Mosser a Edwards 2008, Park a Barbul 2004)

Proliferační fáze následuje za zánětlivou fází a začíná většinou 4. den. Jejím cílem je vytvořit nové cévy a vyplnit defekt granulační tkání. Endotelové buňky podporují růst kapilár, fibroblasty tvoří kolagen, glykosaminoglykany a proteoglykany a vzniká tak granulační tkáň. (Guo a Dipietro 2010; Jeníková a Zeleníková 2013)

Po robustní proliferaci a syntéze extracelulární matrix vstupuje hojení rány do konečné fáze remodelace, kdy jsou redukovány počty buněk. Tato může trvat několik let. V této fázi, která nastává mezi 6. až 10. dnem po vzniku rány, dochází k regresi mnoha nově vytvořených kapilár, takže se cévní hustota rány vrátí do normálu. Dojde k přestavbě extracelulární matrix na architekturu, která se blíží normální tkáni. Rána se v průběhu hojení kontrahuje, což je zprostředkováno kontraktilními fibroblasty,

které se v ráně objevují diferenciací z fibroblastů granulační tkáně. (Guo a Dipietro 2010; Jeníková a Zeleníková 2013)

2.1.2. Hojení chronické rány

U chronických ran je exsudativní a zánětlivá fáze významně prodloužena, některé rány v této fázi stagnují. V chronické ráně je větší počet zánětlivých buněk. Vyskytuje se zde stálý příliv a zvýšená aktivita polymorfonukleárních neutrofilů (PMN). Ačkoliv PMN hrají kritickou roli v obraně hostitele a hojení ran, uvolňují cytolytické enzymy, volné kyslíkové radikály, zánětlivé mediátory a matrix metaloproteinázy (MMP), které způsobují lokální poškození tkáně hostitele. Zánětlivé prostředí obsahuje vysoké hladiny produktů PMN a nízké hladiny inhibitorů proteáz, jako jsou inhibitory tkáňových metaloproteináz (TIMP).(Lobmann a kol. 2002) MMP jsou důležité v rámci normálního procesu hojení rány. Chronické rány v porovnání s akutními mají 30 násobné množství MMP.(Trengove a kol. 1999) Výsledkem je nadměrná degradace extracelulární matrix a selhání progrese hojení rány. Fibronektin a vitronektin degradují v chronické ráně, kdežto v akutní ne. Chronické rány mají nižší hladiny růstových faktorů ve srovnání s akutní ránou, včetně PDGF, FGF, EGF, TGF-β. Nedávné studie ukázaly, že hladiny TGF-β odpovídají změnám ve velikosti rány. (Bosanquet, Harding 2014; Fazli a kol. 2009)

2.2. Bakteriální biofilm

Základní stavební a funkční jednotkou mikrobiálního biofilmu jsou bakteriální agregáty. Agregáty mohou být složeny z buněk jednoho druhu nebo buněk několika druhů. Počáteční interakce mezi bakteriemi, nebo mezi bakteriemi a povrchem je nejčastěji zprostředkována pomocí bičíků nebo pilusů. V biofilmu jsou pak bakterie propojeny a produkují extracelulární matrix, jenž obsahuje mnoho různých typů extracelulárních polymerních látek, včetně proteinů, DNA a polysacharidů. Extracelulární polymerní látky tvoří komponenty pro shlukování bakterií a jejich zapouzdření v bioflmu a působí odchyt volných kyslíkových radikálů, nebo ruší vazbu mnoha tříd antibiotik, jako jsou aminoglykosidy.(Allison a Matthews 1992) U matrix biofilmů neexistují kompletní biochemické profily, protože různé bakterie produkují různé komponenty matrix. Ale matrix může být považována za důležitou vlastnost biofilmu, protože bez ní by biofilm neexistoval. Matrix má roli ochrany proti jiným organismům, fagocytům a antibiotikům, také má roli při tvorbě signalizačních sítí. (Bjarnsholt 2013)

Biofilm vzniká na mnoha površích, jako jsou implantáty, katetry, umělé srdeční chlopně, zuby, kontaktní čočky a způsobuje tak infekci. Mnoho infekcí je však i bez povrchové souvislosti, jako jsou cystická fibróza, zánět středního ucha, chronické rány, chronická osteomyelitida. (Bjarnsholt 2013)

Povrch rány a jeho vlastnosti jsou rozhodujícími faktory, které určují, jaké mikroorganismy osídlí ránu jako první a stanou se součástí biofilmu. Prvotně uchycený biofilm podporuje růst sekundárně kolonizujících mikroorganismů. Tato mikrobiální komunita si vytváří svým metabolismem vlastní mikroprostředí, které umožní jejich růst. Struktura a vývoj biofilmů jsou závislé na podmínkách. (Bjarnsholt 2013, Sellner Švestková 2015)

Bakterie biofilmů ovlivňují hojení ran přímo prostřednictvím produkce destruktivních enzymů a toxinů, ale mohou působit i nepřímo tím, že podporují chronický zánětlivý stav. (Sellner Švestková 2015) Dlouhodobé působení bakterií v chronické ráně vede k dlouhodobé zánětlivé reakci, což má za následek uvolňování volných radikálů a četných lytických enzymů, které mohou mít negativní vliv na buněčné procesy při hojení ran. (Sellner Švestková 2015)

2.2.1. Bakteriální biofilm a antibiotika

Extrémní tolerance k antimikrobiálním činidlům je jedním z charakteristických znaků biofilmů. Tolerance biofilmů k antibiotikům nesmí být zaměňována s antibiotickou rezistencí, neboť i když jsou bakterie v biofilmu odolné antibiotikům a přežijí, neznamená to, že přežijí, když je biofilm narušen. Jsou předpokládány 3 mechanismy, kterými se bakteriální biofilm brání proti působení antibiotik. (Bjarnsholt 2013, Costerton a Steward 2001)

Jedním z mechanismů je možnost pomalého nebo neúplného pronikání antibiotik do biofilmu. Některé studie ukázaly, že některá antibiotika snadno pronikají do bakteriálních biofilmů.(Stewart 1996) Antibiotika jsou většinou rozpuštěna ve vodě a v biofilmu není bariéra, která by je přes matrix biofilmu nepropustila. Nicméně antibiotikum může být biofilmem deaktivováno. Například ampicilin může pronikat biofilmem tvořeným β-laktamáza-negativní *Klebsiella pneumonie*, ale nemůže pronikat biofilmem tvořeným laktamáza-pozitivním divokým kmenem stejného mikroorganismu. (Costerton a Steward 2001)

Druhá hypotéza se týká změny chemického mikroprostředí v biofilmu. Nálezy ze studií miniaturními elektrodami ukázaly, že kyslík může být zcela spotřebován na povrchu biofilmu, což vede k anaerobním místům v hlubokých vrstvách biofilmu. Koncentrační gradient produktů je odrazem těchto substrátů, které jsou buď na povrchu biofilmu, nebo hluboko na aerobních místech. Lokální akumulace kyselých odpadních látek může vést k rozdílům pH větším než 1 ve struktuře biofilmu, což přímo působí proti antibiotikům. (Costerton a Steward 2001)

Třetí a stále spekulativní je hypotéza, že subpopulace mikroorganismů v biofilmu tvoří unikátní a vysoce chráněné fenotypové stavy, kdy je diferenciace buněk podobná tvorbě spor. Hypotéza je podporována tím, že rezistence je přítomna i v nově vzniklých biofilmech i přesto, že jsou příliš tenké na to, aby byly překážkou pronikání antibiotik nebo metabolických substrátů. (Costerton a Steward 2001)

2.3. Nejčastější patogeny v chronické ráně

Nejčastějšími mikroorganismy vyskytujícími se v infekční ráně jsou *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Další patogeny jako *Enterococcus* a *Enterobacteriaceae* jsou také zapojeny. V postižených tkáních mnohdy vytvářejí dohromady synergicky působící flóru. (Beneš 2009, Mama 2014))

2.3.1. Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus patří do skupiny grampozitivních nepohyblivých a nesporulujících koků. Typickým uspořádáním stafylokoků jsou shluky ve tvaru hroznu. S. aureus je jeden z velmi mála koaguláza-pozitivních stafylokoků. Je součástí fyziologické mikroflóry na sliznicích a kůži, proto je vstupní branou stafylokokové infekce porušená integrita kůže nebo sliznic. Stafylokokové infekce mají velmi širokou škálu klinických obrazů, protože *S. aureus* má velmi širokou řadu faktorů virulence. Jeho lytické exoenzymy a toxiny jsou významné substance, které jsou zodpovědné za rychlý průnik a šíření mikrobů v měkkých tkáních, proto jsou infekce kůže a měkkých tkání nejčastějšími infekcemi, které *S. aureus* vyvolává. Interakce α-hemolyzinu produkovaného stafylokokem s disintegrinem a metaloproteinázovou doménou obsahující protein 10, které jsou přítomny ve vnější buněčné membráně, vede k narušení spojů hostitelské buněčné membrány a zhoršuje nekrózu epidermis a dermis. (Inoshima a kol. 2011) Stafylokoky také produkují různé enterotoxiny. Některé z nich jsou termostabilní a přetrvávají v potravinách, které byly tepelně upraveny před požitím. Enterotoxiny vyvolávají průjmy a zvracení. Dalšími infekcemi vyvolanými *S. aureus* kromě raných infekcí jsou: impetigo, folikulitida, furunkl, karbunkl, hnisavá hidradenitida, celulitida, fasciitida, mastitida, infekce kloubů a kostí, pneumonie, sepse, stafylokokový syndrom toxického šoku, stafylokokový syndrom opařené kůže. Nejzávažnější nemoc vyvolaná kmenem *S. aureus* je endokarditida, která má vysokou smrtnost 25-40%. (Beneš 2009, Serra a kol. 2015)

Staphylococcus aureus je jedním z nejčastějších patogenů mezi nemocničními infekcemi i komunitními. Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) způsobuje významnou nemocnost a úmrtnost, je spojen s řadou život ohrožujících infekcí, včetně infekce v místě chirurgického výkonu, bakterémie, pneumonie a infekce spojených s katetrem. Je zde velmi omezená možnost antimikrobiální léčby, protože

je zde vyvinuta rezistence k β-laktamovým antibiotikům. Kmeny MRSA však často disponují i mechanismy rezistence, které jim udělují odolnost k jiným antibiotikům, včetně makrolidů, aminoglykosidů, fluorochinolonů, tetracyklinů a linkosamidů. K léčbě infekcí vyvolaných MRSA se využívá moxifloxacin, levofloxacin, ceftazolin, teikoplanin, daptomycin, tigecylin a linezolid, vůči kterým je MRSA citlivý. (Beneš 2009, Hu a kol. 2015, Serra a kol. 2015)

Staphylococcus aureus je často nacházen v chronických ranách. Je schopen produkovat spoustu potenciálních virulenčních faktorů a povrchových proteinů, které podporují jeho přilnavost k poškozené tkáni a snižují reakce neutrofilů a imunitní odpověď hostitele. *Staphylococcus aureus* spolu s *Pseudomonas aeruginosa* vytváří ve zvýšené míře různé virulenční faktory, jako jsou hemolyziny, lecithinázy, lipázy, které se podílejí na přetrvávání infekce a prodlužují hojení rány.(Bessa a kol. 2015) Jsou schopny modulovat svoji virulenci pro lepší přežití a vytrvalost v různých klinických podmínkách. *S. aureus* má také vysokou schopnost produkovat biofilm s nízkými rozdíly mezi izoláty MRSA a ne-MRSA kmeny, ale biofilm není tak silný jako v kombinaci s *Pseudomonas aeruginosa*. (Fazli a kol. 2009, Mihai a kol. 2014, Serra 2015)

2.3.2. Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní lehce zahnutá tyčka s jedním polárně umístěným bičíkem. Nevytváří pouzdro, ale produkuje velké množství hlenu, který chrání celou bakteriální kolonii. *Pseudomonas aeruginosa* produkuje pigmenty pyocyanin, pyorubin, pyomelanin a pyoverdin. Pach, který *P. aeruginosa* vydává, se podobá vůni ovoce či květů. (Beneš 2009)

Pseudomonas aeruginosa je ve většině případů nozokomiální patogen. Zřídka je součástí normální mikroflóry člověka, ale může být izolována z kůže, nosní sliznice, krku a ze stolice. Pseudomonády jsou odolné vůči dezinfekčním prostředkům na bázi kvarterních amoniových solí, ve kterých se mohou i množit. Pseudomonády se mohou vyskytovat také v půdě, vodě a na rostlinách. (Beneš 2009)

Zdravý člověk je k infekci *P. aeruginosa* vysoce rezistentní. Velmi vnímaví k infekci jsou pacienti s porušenou funkcí kůže nebo sliznic, které stojí za rozvojem infekce. Jsou jimi pacienti s chronickým plicním onemocněním, s cystickou fibrózou,

popáleninami, s nitrožilním či močovým katetrem nebo s endotracheální kanylou. (Beneš 2009)

Pseudomonas aeruginosa napadá patologicky změněné kožní plochy a vyvolává jejich infekce. Kromě kůže mohou pseudomonády kontaminovat oční čočky a vyvolat keratitidu, která je velmi nebezpečná. Velmi často jsou jejich cílem dýchací cesty a to hlavně u pacientů s cystickou fibrózou, což dále často vede k rozvoji pneumonie. Nejnovější studie ukazují, že *P. aeruginosa* je druhou nejčastější příčinou nozokomiální pneumonie.(Weinstein 2005) Infekce močových cest vyvolané pseudomonádami jsou nejčastěji nozokomiálního původu. Pseudomonády také mohou vyvolat střevní infekce, nejčastěji u neutropenických pacientů. Pseudomonádová bakterémie postihuje osoby vyčerpané některou základní nemocí a vykazuje u nich 50% smrtnost. Hematogením rozsevem infekce může vzniknout septická artritida, osteomyelitida nebo endokarditida. Pseudomonády také mohou vyvolat meningitidu, která se většinou vyvíjí jako následek operace nebo úrazu. (Beneš 2009, Lister a kol. 2009)

Ve srovnání s ostatními druhy bakterií izolovaných z chronické rány tvoří všechny kmeny *P. aeruginosa* intenzivně biofilm. *Pseudomonas aeruginosa* má nejvyšší kapacitu vytvořit komplexní strukturu biofilmu.(Mihai a kol. 2014) Schopnost tvořit biofilm je považována za jednu z jejích hlavních strategií pro přežití při napadení hostitele. *Pseudomonas aeruginosa* může tvořit biofilmy prakticky na jakémkoliv povrchu, za rozdílných nutričních nebo ekologických podmínek. Struktura a vývoj je závislý na podmínkách. Velmi důležité složky matrix biofilmu produkované *P. aeruginosa* jsou polysacharidy Pel a PSL. PSL je přítomen ve všech fázích vývoje biofilmu a je to klíčový komponent ve zralých biofilmech. *Pseudomonas aeruginosa* produkuje virulenční faktory, zejména rhamnolipid, který účinně eliminuje syntézu polymorfonukleárních neutrofilů (PMN) stejně jako leukocidní toxin. Zničení PMN způsobuje jejich trvalý příliv, protože jsou stále aktivovány a to udržuje ránu v zánětlivé fázi. Odstranění PMN může hrát pozitivní roli pro další kolonizaci bakterií v ráně. U polymikrobních infekcí zvyšuje virulenci biofilmu a tím podporuje vývoj dalších mikroorganismů. Alginát (jeho mukoidní fenotyp) produkovaný *P. aeruginosa* zlepšuje trojrozměrnou strukturu biofilmu, působí jako zachycovač volných kyslíkových radikálů, brání fagocytóze a váže mnoho kationtových antibiotik, jako jsou aminoglykosidy. Elastázy *P. aeruginosa* převadí pro enzymy MMP na aktivní enzymy. Aktivací několika MMP způsobuje *P. aeruginosa* poškození hemoragické tkáně

a nekrózu infikované tkáně. MMP působí přednostně na laminin a kolagen typu IV a způsobuje jejich destrukci. Degradace kolagenu typu IV může způsobit destrukci membrán a změnu kapilár s poškozením okolních tkání. Infikované rány *P. aeruginosa* mají výrazně větší plochu, než rány bez ní. Její přítomnost v ráně oddaluje nebo dokonce znemožňuje hojení. (Bjarnsholt 2008, Bjarnsholt 2013, Fazli a kol. 2009, Mihai a kol. 2014, Serra 2015)

Pseudomonas aeruginosa představuje vážný problém pro léčbu infekce, neboť má velkou odolnost proti více třídám antibiotik. Volba antibiotik se musí řídit citlivostí izolovaného kmene u konkrétního pacienta. Je známo, že doba antibiotické léčby je u pseudomonádových infekcí delší než u srovnatelných infekcí vyvolaných běžnými patogeny.(Beneš 2009) Schopnost vyvinout rezistenci vůči antibiotiku v průběhu léčby komplikuje výběr nejvhodnějšího antibiotika. *Pseudomonas aeruginosa* může vyvinout rezistenci na antimikrobiální látky prostřednictvím akvizice genů rezistence v plazmidech nebo prostřednictvím mutací, které ovlivňují expresi nebo funkci chromosomálně kódovaných mechanismů. *Pseudomonas aeruginosa* vykazuje nejvyšší míru rezistence na fluorochinolony s odolností proti ciprofloxacinu a levofloxacinu. Pro léčbu se využívají cefalosporiny 3. - 4. generace, karbapenemy, aztreonam, aminoglykosidy a colistin. U závažných infekcí je často podávána kombinace antibiotik. Léčba chronické rány zahrnuje systémové používání antimikrobiálních látek. Lokální antibiotika jsou také důležitá, ale rozvoj lékové rezistence omezuje jejich klinické použití. K léčbě souběžné infekce *S. aureus*, nebo MRSA a *P. aeruginosa* se používají kombinace piperacilin/tazobaktam, meropenem, ertapenem a ciprofloxacin. (Beneš 2009, Lister a kol. 2009, Serra a kol. 2015)

2.4. Mikrobiologické vyšetřovací metody

Mikrobiologické vyšetřovací metody můžeme rozdělit do několika skupin. Základní dělení je na diagnostiku přímou a nepřímou. Metody přímého průkazu dokládají přítomnost mikrobiálního agens ve vyšetřovaném vzorku, zatím co metody nepřímého průkazu zjišťují přítomnost infekce na základě specifické imunitní odpovědi. Mezi přímé metody se řadí mikroskopie, kultivace, biochemické testy, testy na průkaz antigenu a DNA. Mezi nepřímé metody řadíme testy, kterými prokazujeme přítomnost protilátek. (Beneš 2009)

2.4.1. Mikroskopie

Mikroskopie je jednou z nejstarších metod, díky které můžeme sledovat morfologii bakterií. Tato metoda pochází z 2. poloviny 17. století, kdy byl poprvé použit světelný mikroskop Antonem von Leeuwenhoekem. Mikroskopy dělíme podle jejich principu osvětlení a detekce vzorku. (Geeta Sumbali 2009)

Světelný mikroskop je nejčastěji využívaný mikroskop v mikrobiologické laboratoři. Můžeme jím sledovat preparáty jak nativní, tak i fixované. Pro lepší rozlišení se preparáty barví, v klinické mikrobiologii nejčastěji barvením dle Grama, které nám rozliší gram-negativní a gram-pozitivní bakterie. Barvení Ziehl-Neelsen slouží k průkazu acidorezistentních bakterií. V laboratořích je používáno nejčastěji k průkazu mykobakterií, a tedy je to nejčastější metoda k diagnostice tuberkulózy. Výhodou světelné mikroskopie je, že je levná, snadná, nenáročná na technické vybavení. Nevýhodou je, že vyžaduje interpretaci zkušeným pracovníkem.

Při mikroskopii v temném poli je objekt osvícen a pozadí je temné. Tato metoda je nejčastěji používána pro diagnostiku syfilis, protože pomocí mikroskopie v temném poli identifikujeme Treponemu pallidum. (Geeta Sumbali 2009)

Ve flourescenční mikroskopii se využívají fluorochromy, např. auramin O, fluorescein, rhodamin. Fluorochromy podle svých chemických vlastností reagují přímo s cílovými strukturami, jako jsou DNA, RNA, bílkoviny, lipidy. Když mikroorganismus obarvíme fluorochromem, vložíme do fluorescenčního mikroskopu a osvítíme ultrafialovým zářením, vyvolá to fluorescenci, kdy objekt září na tmavém pozadí. Fluorochromy mohou být selektivní pro různé mikroorganismy, např. auramin O, který září žlutě po expozici ultrafialového záření, má vysokou afinitu k voskovým substancím *Mycobacterium tuberculosis*. (Geeta Sumbali 2009)

Elektronová mikroskopie pracuje s elektrony, které mají menší vlnovou délku než je vlnová délka světla, má větší rozlišovací schopnost a umožňuje vyšší zvětšení. Díky tomu můžeme pozorovat subcelulární struktury a viry. Jsou 2 typy elektronového mikroskopu a to transmisní elektronový mikroskop a rastrovací elektronový mikroskop. Výsledkem rastrovací elektronové mikroskopie je plastický trojrozměrný obraz. Rastrovací elektronový mikroskop je používán pro pozorování povrchu neporušených buněk, bakterií, hub, virů, protozoií, dají se jím pozorovat morfologické změny

v tkáních, které jsou napadeny mikroorganismem. (Schindler 2014) Transmisní elektronový mikroskop je používán k detekci virů a pozorování vnitřních struktur mikroorganismů. Nevýhodou je, že nemohou být pozorovány živé organismy, protože nepřežijí destruktivní působení proudu elektronů. (Schindler 2014)

Výhodou mikroskopie je, že přináší rychlou informaci o přítomnosti mikroorganismů, především v primárně sterilních lokalitách. Často je doplněna výsledky kultivace. Samotná mikroskopie může být dostatečná pro stanovení diagnózy v případech, kdy původce nemoci má typické, nezaměnitelné morfologické charakteristiky jako je tomu např. při tuberkulóze, infekcích mykotických nebo parazitických. (Beneš 2009)

2.4.2 Kultivace

Kultivační techniky mají též bohatou historii, která začíná Kochem. Základem kultivace je dostat čistou kulturu, která nám umožní zkoumat její vlastnosti a určit o jaký druh se jedná. Při kultivaci je důležité, aby byly zachovány podmínky pro růst bakterie, proto se využívají různá živná média s obsahem živin, které jsou nezbytné pro růst mikrobiálních organismů. Důležitá je také teplota, pH a optimální atmosféra (Beneš 2009, Mehrotra 2009)

Kultivační půdy můžeme rozlišit podle původu na přírodní, semi-syntetické a syntetické. Syntetické půdy mají známé chemické složení jak z hlediska kvalitativního, tak i kvantitativního. Komplexní půdy podporují růst velké části bakterií a jsou využívány velmi často v rutinní praxi. Příkladem základní a zároveň diagnostické půdy je krevní agar. U kmenů vyznačujících se hemolýzou na něm vidíme hemolytické vlastnosti bakteriálních kmenů. Selektivní půdy slouží k podpoře růstu jednoho druhu a potlačení růstu nežádoucích bakterií. Příkladem selektivní půdy je Mac Conkey agar nebo Endův agar. Selektivně-diagnostické půdy nám umožňují jak kultivaci, tak zároveň i identifikaci kmene. Takovou půdou je například Mac Conkey agar, který je používán pro izolaci, kultivaci a identifikaci druhů bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a některých nefermentujících bakterií a deoxycholát-citrátový agar, který je používán pro kultivaci a identifikaci druhu rodu *Salmonella*. (Mehrotra 2009)

K izolaci a základní identifikaci běžných patogenů jsou potřeba 2-3 dny. U anaerobů a plísní se nám doba potřebná k identifikaci prodlužuje na 3 – 5 dnů,

u mykobakterií trvá identifikace pomocí kultivace 4 – 8 týdnů. Tato metoda může být nahrazena jinými diagnostickými metodami. Kultivace si však svojí významnost ponechává při určování citlivosti mikroba na antibiotika, kde je nenahraditelná. Vyšetření diskovou metodou je nejrozšířenější metodou pro určení citlivosti mikroba na dané antibiotikum. Výhodou kultivace je, že je snadná, levná, nenáročná na techniku, nevýhodou je, že vyžaduje interpretaci zkušeným pracovníkem. (Beneš 2009)

2.4.3. Biochemické testy

Biochemické testy se využívají k identifikaci nebo odlišení 2 různých kmenů bakterií. Identifikace je založená na schopnosti bakterií fermentovat různé cukry nebo na průkazu specifických enzymů. Mezi tyto testy patří např. CAMP test, test na katalázu, koagulázový test, oxidázový test, test na ureázu atd. (Vasanthakumari 2009)

2.4.4. Průkaz antigenní struktury

Metody pro průkaz antigenní struktury dokazují přítomnost specifických mikrobiálních antigenů ve vyšetřovaném vzorku, proto jimi vždy zjišťujeme konkrétní patogeny. Těmito metodami můžeme prokázat ne jen živé patogeny, ale i mrtvé nebo i částečně rozpadlé. Principem těchto metod je reakce mezi hledaným antigenem a diagnostickou protilátkou. (Beneš 2009)

2.4.4.1. Latexová aglutinace

Velmi často využívanou metodou pro stanovení antigenů je latexová aglutinace. V této metodě je antigen-specifická protilátka navázaná na latexovou částici a smíchána se vzorkem. Pokud je ve vzorku přítomen antigen odpovídající dané protilátce, dojde k viditelnému vzniku sraženiny. Výhodu metody je její rychlost, často je využívána jako bed side test k rychlému průkazu meningitidy. (Zourob 2009)

2.4.4.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA je široce využívaná diagnostická metoda pro detekci a kvantifikaci specifických antigenů nebo protilátek v daném vzorku. Tato metoda je odvozena od

radioimmunoassay (RIA), kterou poprvé popsal Berson a Yalow v roce 1960. Její výhodou je vysoká citlivost, kdy k detekci stačí malé množství vzorku. Její nevýhodou je, že mohou vznikat nespecifické vazby antigen-protilátka a že pro detekci antigenu musí být generována známá protilátka. ELISA je modifikována do několika typů. Přímá ELISA používá značenou primární protilátku, která reaguje přímo s antigenem. Nepřímá ELISA využívá pro detekci značenou sekundární protilátku (Gan a Patel 2013)

Metoda umožňuje detekci velmi malého množství antigenů, jako jsou proteiny, peptidy, hormony, nebo protilátky ve vzorku. V ELISA testu jsou použity enzymy, které jsou vázány se specifickými protilátkami, nejčastěji se jedná o alkalickou fosfatázu a křenovou peroxidázu. Test se provádí obvykle v 96-jamkových destičkách. Antigen se váže na specifickou protilátku. Chromogenní substrát pro enzym poskytuje viditelnou barevnou reakci nebo fluorescenci, což nám dokládá přítomnost hledaného antigenu. Kvantita nebo kvalita je určována na základě kolorimetrického měření. Fluorogenní substráty mají vyšší citlivost než substráty chromogenní. (Gan a Patel 2013)

Jedním z nejpopulárnějších forem ELISA testu je sendvičová ELISA. Tato technika se používá k identifikaci konkrétního vzorku antigenu. Povrch destičky je pokryt známým množstvím protilátky pro záchyt antigenu. Nespecifická vazebná místa jsou blokována použitím hovězího sérového albuminu. Purifikovaná specifická protilátka k zachycení antigenu zjednodušuje test a zvyšuje jeho specifičnost a citlivost. (Gan a Patel 2013)

Kompetitivní ELISA je založena na principu kompetice mezi antigenem vzorku a značeným antigenem. Ty spolu soutěží o navázání na primární protilátku, která je navázána na dně destičky. Čím více je navázáno neznačeného antigenu ze vzorku, tím menší je barevný signál. Pokud by se vázalo více značeného antigenu, byla by větší barevná reakce a znamenalo by to menší koncentraci hledaného antigenu ve vzorku. Hlavní výhodou této modifikace je vysoká citlivost. V komplexních směsích antigenů zachytí daný antigen, i když je přítomno relativně malé množství. Novou technikou je multiple and portable ELISA, která je pro svoji nízkou cenu vhodná pro velké populační screeningy. Multiple and portable ELISA umožňuje stanovení více antigenů najednou. (Gan a Patel 2013)

2.4.4.3. Imunofluorescence

Imunofluorescence je metoda využívána k detekci a lokalizaci antigenů v diagnostice bakteriálních, fungálních, parazitárních a virových onemocnění. Metoda je také využívána pro detekci protilátek v diagnostice infekčních nemocí. Imunofluorescence je vhodnou alternativou k enzymové imunoanalýze. (Koneman a kol. 2006)

Ve fluorescenční imunoanalýze je specifická protilátka konjugovaná s fluorochromem. Fluorochrom je taková sloučenina, která je schopná fotoexcitace a následné fluorescence. Fluorochrom nemění imunologickou reaktivitu. (Koneman a kol. 2006)

Konjugované antisérum je přidáno k buňkám nebo tkáním na sklíčku, kde se zafixuje s antigenem za vzniku stabilního imunokomplexu. Po vymytí nereagujícího materiálu se preparát vysuší a pozoruje se ve fluorescenčním mikroskopu, který je vybaven příslušným zdrojem světla a filtry. Antigeny specificky vázané k fluorescenčně značené protilátce jsou lokálně detekovány emisí světla na tmavém pozadí. Barva fluorescenčně emitovaného světla je závislá na typu fluorochromu, který byl konkrétně použit. (Koneman a kol. 2006)

Techniky imunofluorescence rozdělujeme na přímé nebo nepřímé. Přímé fluorescenční testy jsou používány převážně pro detekci antigenu, oproti tomu nepřímé metody mohou být použity jak pro detekci antigenu, tak i detekci protilátky. Přímé imunofluorescenční testy se vyznačují jednoduchostí, rychlostí a menší přítomností nespecifických reakcí, ale mohou být méně citlivé, než metody nepřímé. Nepřímé metody jsou více citlivé a produkují jasnější fluorescenci, ale za to mohou být méně specifické, neboť je zde zvýšená cross-reaktivita. (Koneman a kol. 2006)

2.5. Detekce DNA

Význam těchto metod v mikrobiologické diagnostice stále stoupá. Těmito metodami je zjišťována přítomnost specifických úseků nukleových kyselin. Jednou z těchto metod je hybridizace úseků DNA (nebo RNA) pomocí genových sond. Genom

můžeme vyšetřit pomocí restrikčních endonukleáz, které DNA štěpí selektivně v místech určité kombinace nukleotidů. Nejpracnější metodou je sekvenace genu, která nám přímo určuje pořadí bází. Nejrozšířenější jsou metody PCR a její modifikace, kde je hybridizace spojena s amplifikací genů. (Beneš 2009)

2.5.1. PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda, která od svého objevu změnila biologickou vědu. PCR poprvé umožnila specifickou detekci a výrobu velkého množství DNA. Díky této technice může být rychle a velmi selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakékoliv DNA. PCR je využívanou metodou v klinické praxi k diagnostice onemocnění. Rovněž je využívaná při klonování, v genomových studiích nebo i v soudním lékařství, kde je potřeba namnožení jakéhokoliv genu z malého vzorku DNA. Jako zdroj DNA mohou být různé tkáně a organismy, včetně periferní krve, kůže, vlasů, slin, mikrobů. Vzhledem k citlivosti testu je potřebné pouze stopové množství DNA. (Alberts 1998, Garibyan 2013)

Pro test PCR je důležitá přítomnost templátové DNA, podle které jsou syntetizovány její kopie, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy. DNA polymeráza je klíčový enzym, který spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku produktu PCR. DNA polymeráza je izolována z termofilní bakterie. Její vlastností je stabilita při vysokých teplotách, takže není rozkládána vysokou teplotou. Deoxynukleotidy potřebné pro PCR jsou deoxyadenosintrifosfát, deoxythymidintrifosfát, deoxycitidintrifosfát, deoxyguanosintrifosfát, které jsou součástí DNA. Primery jsou oligonukleotidy, které jsou každý komplementární k sekvenci jednoho řetězce dvoušroubovice na opačných koncích úseku, který má být amplifikován. Primery tedy ohraničují amplifikovaný segment. (Alberts 1998, Garibyan 2013)

Uvedené složky se smísí ve zkumavce nebo 96-jamkové destičce, podle typu přístroje, a vloží se do něj. PCR cykler je v podstatě tepelný cyklovač. Stroj zvyšuje a snižuje teplotu bloku v oddělených, přesných a předem naprogramovaných krocích. Směs se nejdříve zahřeje nad teplotu tání dvouřetězcové komplementární DNA, což zapříčiní její denaturaci. Poté je teplota snížena, aby se mohli navázat primery. K vazbě primerů na cílovou DNA dochází pouze v případě, že jsou sekvence komplementární.

V další fázi se teplota opět zvýší a z obou primerů jsou syntetizovány nové řetězce DNA v přítomnosti DNA polymerázy a všech čtyř nukleotidů. V dalších cyklech reakce slouží i nově nasyntetizované molekuly DNA jako templáty. Pro amplifikaci se obvykle používá 20 – 30 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předcházejícímu cyklu zdovnásobí. (Alberts 1998 , Garibyan 2013)

Při vizualizaci PCR produktů se využívá barvení ethidium bromidem nebo značení PCR primerů či nukleotidů fluorofory (fluorescenční barviva) před amplifikací. Nejčastěji využívanou metodou pro analýzu PCR produktů je elektroforéza na agarózovém gelu. Elektroforéza umožňuje stanovit přítomnost a velikost PCR produktu. Pro určení výsledku nám slouží standard, který nám umožní určit velikost PCR produktu. PCR slouží pro detekci přítomnosti či nepřítomnosti specifického DNA produktu. Je tedy vhodná k identifikaci patogenů. (Garibyan 2013)

PCR má také svá omezení. Jakákoliv forma kontaminace vzorku např. při izolaci DNA nebo amplifikačními produkty z předešlé PCR, i stopovými množstvími, může vést k zavádějícím výsledkům. PCR může být použita pouze pro identifikaci známých patogenů nebo genů. Také se může stát, že primery mohou na cílové DNA nasedat nespecificky k sekvencím, které jsou podobné, ale ne zcela identické. (Garibyan 2013)

2.5.2. Real-time PCR

Real-time PCR představuje revoluci v diagnostice lidských patogenů v laboratořích klinické mikrobiologie. Tato metoda kombinuje PCR s detekcí amplifikovaného produktu pomocí fluorescenční sondy v jednom přístroji, tudíž PCR a její detekce výsledků není oddělena jako u konvenční PCR. Real-time je podstatně rychlejší než klasická PCR, protože PCR a detekce amplifikovaného produktu může být dokončena i za hodinu, nebo méně. Real-time PCR poskytuje rovnocennou citlivost a specifičnost jako klasická PCR a ještě navíc zde může být kvantifikováno množství templátu. Vzhledem k tomu, že je celý proces prováděn ve stejné uzavřené nádobě, je riziko uvolnění amplifikovaných nukleových kyselin do životního prostředí a kontaminace následných analýz v porovnání s klasickými metodami PCR zanedbatelné. Kombinace vynikající citlivosti a přesnosti, s nízkým rizikem kontaminace, a rychlostí, učinila z real-time PCR atraktivní alternativu ke konvenčním

metodám kultivačním nebo imunologickým, využívanou k diagnostice infekčních nemocí. (Espy a kol. 2006)

Real-time PCR má 3 fáze: exponenciální fázi, lineární fázi a fázi plató. V exponenciální fázi se zvyšuje exponenciálně produkt, protože reakční činidla nejsou omezená. Lineární fáze je charakterizovaná lineárním nárůstem produktu. PCR se nakonec dostane do fáze plató při pozdějších cyklech, ale množství produktů se nezmění, protože některá činidla došla. Real-time PCR využívá skutečnost, že množství PCR produktů v exponenciální fázi je za ideálních podmínek v poměru k množství původního templátu. V případě 100% účinnosti se během exponenciální fáze bude PCR produkt exponenciálně zdvojovat během každého cyklu. Data získaná v exponenciální fázi jsou udávaná jako hodnota C_T. C_T je počet cyklů, ve kterých flourescence dosáhne prahové hodnoty (treshold cycle). Hodnota je přímo úměrná množství cílové sekvence přítomné ve vzorku. Jak genomová, tak i reverzní transkripcí přepsaná cDNA mohou být použity jako templáty pro real-time PCR. (Yuan a kol. 2006)

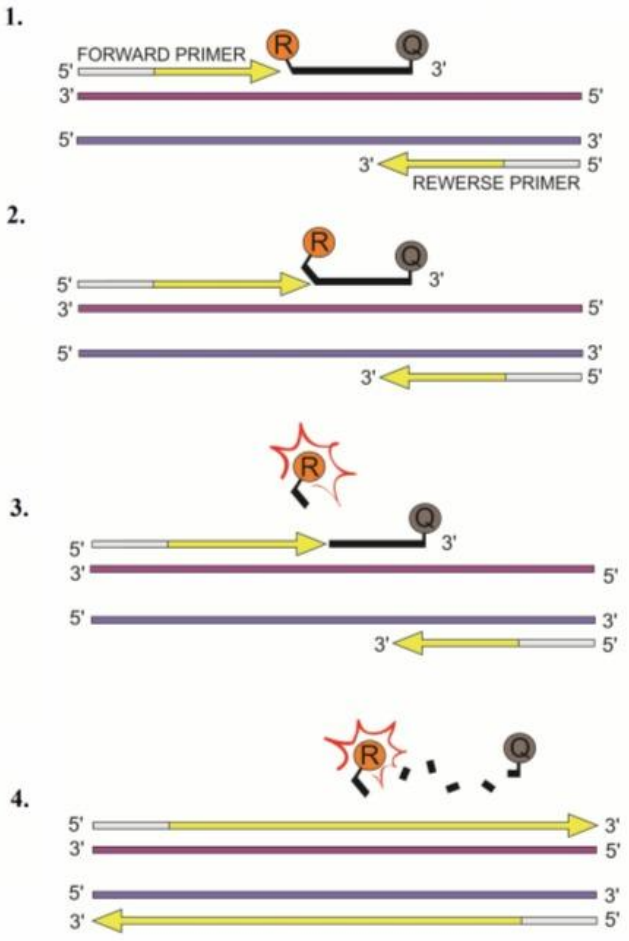
Pro specifitu testu jsou důležité PCR primery. Primerový pár, který pouze zesiluje jeden produkt, poskytne nejlepší citlivost testu. PCR primery by měly mít nízký potenciál k vytváření sekundárních struktur, včetně sebe a hybridizace s dalšími oligonukleotidy v PCR. Kritickým krokem pro PCR je preanalytická fáze, kdy dochází k extrakci nukleových kyselin. (Espy a kol. 2006)

Jednou z metod detekce PCR produktů je použití DNA-interkalačního barviva SYBR Green, které slouží pro detekci nahromaděné jakékoliv dvouvláknové DNA. Barvivo se váže na menší žlábek DNA. Vazba barviva na dvouvláknovou DNA značně zvyšuje fluorescenci. V průběhu cyklů se množství dvouvláknového PCR produktu exponenciálně zvyšuje, a proto se váže více barviva a tím se zvyšuje fluorescenční signál. Fluorescenční signál je maximální na konci každé prodlužovací fáze PCR, kdežto nízký nebo vůbec žádný je během denaturační fáze. SYBR Green není sekvenčně specifický, proto mohou být detekovány též nespecificky amplifikované produkty PCR a dimery primerů. (Espy a kol. 2006; Velden a kol. 2003)

Citlivá a specifická detekce je možná s použitím fluorescenčních sond. V klinické mikrobiologii se nejčastěji používají 3 typy metod pro detekci nukleových kyselin: TaqMan sondy, molecular beacons a FRET hybridizační sondy. První barvivo

je fluorescenční barvivo a druhé může být buď zhášecí barvivo, nebo jiné fluorescenční barvivo, které může absorbovat fluorescenční světlo předávané z prvního barviva. Mechanismus pro dosažení fluorescenčního signálu je pro každou sondu různý. (Espy a kol. 2006)

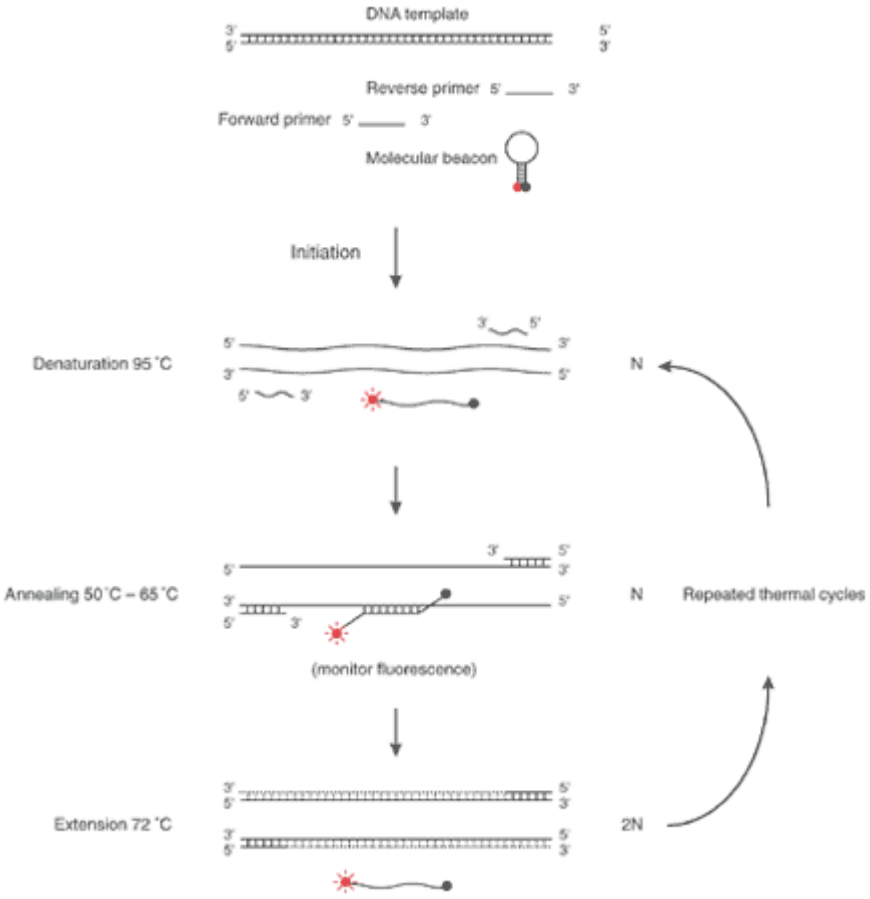
TaqMan sonda je krátký oligonuklotid (DNA), který obsahuje 5´fluorescenční barvivo a 3´zhášecí barvivo. Pro generování světelného signálu se musí sonda navázat na komplementárním řetězci DNA při teplotě 60°C a při této teplotě štěpí DNA polymeráza 5´konec sondy 5´nukleázovou aktivitou, oddělující fluorescenční barvivo od zhášecího. (Espy a kol. 2006)



Obrázek 1. Princip detekce pomocí Taq Men sondy.

(Kurcek 2011)

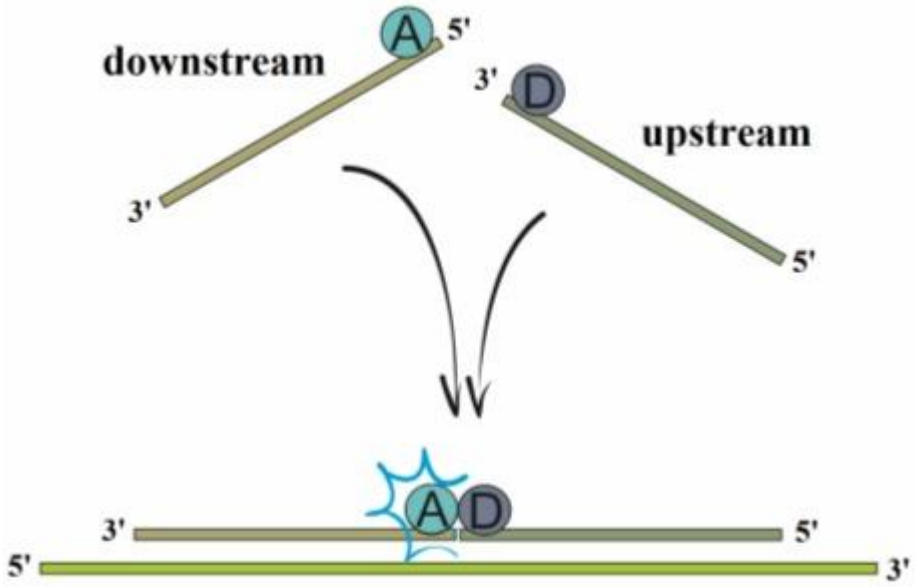
Molecular beacons (molekulární majáky) jsou podobné TaqMen sondám, ale nejsou štěpeny 5´nukleázovou aktivitou DNA polymerázy. Fluorescenční barvivo je umístěno na 5´konci oligonukleotidu sondy a zhášecí barvivo je umístěno na 3´konci oligonukleotidu sondy. Oblasti na každém konci sondy jsou k sobě komplementární a při nízkých teplotách, na konci žíhání, vytvářejí strukturu vlásenky. Centrální oblast sondy je komplementární k oblasti amplifikace PCR produktu. Při vysokých teplotách jsou amplifikační produkt i PCR sondy jednovláknové. Při poklesu teploty se centrální oblast sondy naváže hledanou sekvenci a způsobí oddělení fluorescenčního barviva od zhášecího, čímž jsou účinky zhášecího barviva odstraněny a může být detekován fluorescenční signál. (Espy a kol. 2006)



Obrázek 2. Princip detekce pomocí molecular beacons

(Bonetta 2005)

FRET hybridizační sondy jsou dvě DNA sondy určené k nasednutí vedle sebe v produktu PCR. Sonda má fluorescenční barvivo na 3´ konci a druhá sonda má akceptor na 5´ konci. Pokud neexistuje specifická DNA, na kterou by se sonda navázala, nedochází k FRET přenosu mezi dvěma fluorescenčními barvivy, protože vzdálenost mezi barvivy je příliš velká, a svítí pouze donorová fluorescenční molekula. (Espy a kol. 2006)



Obrázek 3 Princip detekce FRET sondy

(Kurcek 2015)

3. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo kvantifikovat druh *Pseudomonas aeruginosa* z biopsie chronické rány pomocí metod kultivace a real-time PCR a výsledky těchto dvou metod porovnat.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál a chemikálie

- biopsie z rány prasete
- RNAzol RT - Sigma – Aldrich (USA)
- chloroform – Lachner (Neratovice, ČR)
- 96% ethanol – PENTA (Praha, ČR)
- Citrát sodný – Lachner (Neratovice, ČR)
- Sybr select Master mix – Applied biosystems (Austin, USA)
- primer PA2
    - Cíl: *Pseudomonas aeruginosa* 16S rDNA
    - Název: PA2-F, PA2-R
    - Forward 5´- 3´: CAA AAC TAC TGA GCT AGA GTA CG
    - Reverzní 5´- 3´: TAA GAT CTC AAG GAT CCC AAC GGC T
    - Teplota žíhání: 62 °C
    - Koncentrace v reakci: 0.1 µM
    - Délka produktu: 215 nt
    - Reference: Matsuda 2007
- Peptonová voda (tlumivá) – Merck (Darmstadt, Německo)
- Trizma-base – Sigma-Aldrich (USA)
- EDTA – Sigma-Aldrich (USA)
- Columbia CAP agar,
- Columbia CAP agar s tetracyklinem
- Mac Conkey agar,
- cetrimidový agar

4.2. Pomůcky a přístroje

Pomůcky

Pomůcky pro přípravu homogenátu z biopsie: skalpelové čepelky, držátko skalpelových čepelek, Petriho misky, mikrozkumavky, stojan na mikrozkumavky, pinzeta, ocelové kuličky, kahan, rukavice.

Pomůcky pro kultivaci: multikanálová pipeta, špičky, 96jamkové mikrotitrační destičky, rukavice.

Pomůcky pro izolaci DNA: mikrozkumavky, automatické pipety, špičky, stojan na mikrozkumavky, stopky, rukavice.

Pomůcky pro PCR: mikrozkumavky, stojan na mikrozkumavky, PCR stripy, sterilní špičky, sterilní špičky s filtrem, automatické pipety, destičky na stripy, rukavice

Přístroje a zařízení

- Laminární box – Erlab
- Homogenizátor - QIAGEN
- Termoshaker – BIOSAN
- Spektrofotometr – VARIAN
- Vortex – LabDancer
- Centrifuga – Thermo scientific
- Termální box – Jouan
- PCR analyzátor – Applied Biosystems

4.3. Metodické postupy

4.3.1. Příprava homogenátu z biopsie rány prasete

Biopsie se získávaly z infikovaných ran prasete, kdy na levém boku byly rány léčené a na pravém boku rány neléčené. Biopsie se odebíraly v průběhu měsíce v určitých intervalech. První biopsie se odebírala 7. den po umělém infikování rány uměle vytvořeným biofilmem, který byl vytvořen z pěti mikrobiálních kultur, které se nejčastěji v infekční ráně u lidí vyskytují a to *Staphylococcus aureus, Enterococcus*

faecalis, Streptococcus agalactiae, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli. Další odběr byl poté 10., 14., 17. den a poslední odběr byl 24. den po infikování rány.

Získaná biopsie se pomocí skalpelu rozkrájela a rozmělnila na co nejmenší kousky a vložila se zpět do 2,5 ml mikrozkumavek s peptonovou vodou společně s ocelovou kuličkou. Mikrozkumavky se vložily do homogenizátoru, kde se nechaly několik minut, dokud směs nebyla homogenní.

4.3.2. Kultivace

Zásobní roztok

Peptonová voda

25,5 g substrátu pro peptonovou vodu se rozpustilo v 1 l demineralizované vody, v případě potřeby v menších nádobách. Autoklávovalo se to 15 min při 121 °C. Výsledné pH bylo 7±0,2 v 25 °C. Skladováno při pokojové teplotě.

Postup

Do mikrotitrační destičky se rozpipetovalo 90 µl peptonové vody, kdy první jamka zůstala prázdná. Do první prázdné jamky se napipetoval homogenát a dále se rozpipetoval s Peptonovou vodou v poměru 1:9 (10 µl vzorku:90 µl Peptonové vody) od koncentrace 10^{1} do 10^{-10}. 100 % vzorek a takto rozředěný vzorek se po 10 µl nanášel v koncentrační řadě na různé agary tak, že na jednom agaru byla obsažena celá koncentrační řada. Vzorky se nanášely postupně na Columbia CAP agar, Columbia CAP agar s tetracyklinem, Mac Conkey nebo Endův agar, cetrimidový agar. Pro naše účely byl nejdůležitější cetrimidový agar, který je selektivní pro *Pseudomonas aeruginosa*. Aby se nanesené koncentrace nesmíchaly, nechaly se plotny chvíli stát. Když byly usušeny, tak byly vloženy do termostatu, který byl vytemperován na 37 °C. Odečet nárůstu bakterií se prováděl za 24 hodin. Zbylý homogenát byl zamražen na -20 °C a dále použit pro izolaci DNA.

4.3.3. Izolace DNA

Zásobní roztoky

0,1 M roztok citrátu sodného v 10 % etanolu

Navážilo se 2,941 g citrátu sodného. Toto množství se rozpustilo v 10 ml 100 % etanolu. Roztok byl doplněn 90 ml destilované vody. Uchovával se při pokojové teplotě.

75% etanol

78 ml 96 % etanolu se nalilo do 100 ml odměrné baňky a dolilo se do 100 ml destilovanou vodou. Uchovával se při laboratorní teplotě.

TE pufr (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH = 8)

10 ml 1 M Tris a 4 ml 0,25 M EDTA bylo doplněno deionizovanou vodou do objemu 1000 ml. Roztok se autoklávoval při 121 °C po dobu 20 min. Uchovával se při laboratorní teplotě.

Pro práci s tímto roztokem se roztok zředil destilovanou vodou v poměru 1:9 (1 ml TE pufru:9 ml vody)

Postup

Vzorky uložené v mrazáku při -20 °C se nechaly rozmrazit při laboratorní teplotě. Do čistých mikrozkumavek bylo pipetováno 100 µl homogenátu, který byl před pipetováním zvortexován, aby se dosáhlo homogenity vzorku při pipetování. K homogenátu se přidalo 500 µl TRIZOLu, směs se promíchala a nechala se 5 minut inkubovat.

Ke směsi buňky/TRIZOL se přidalo 100 µl chloroformu a důkladně se zvortexovala. Směs se inkubovala 5 minut při 15-30 °C, poté se zcentrifugovala (12 000 rmp, 15 min, 2-8 °C).

Po centrifugaci se odstranila vodná fáze obsahující RNA. Ke směsi se přidalo 150 µl (100 %) etanolu a po následném důkladném promíchání se směs nechala inkubovat při

15-30 °C po dobu 2-3 minut. Po inkubaci následovala centrifugace při pokojové teplotě po dobu 5 minut a 12 000 rmp.

Po centrifugaci se odstranil supernatant obsahující proteiny. Zbylý pelet obsahující DNA se promyl 0,1 M roztokem citrátu sodného v 10 % etanolu, kterého se přidalo 500 µl. Směs se promíchala a vložila do vodní lázně, která měla teplotu 15-30 °C, a za stálého míchání zde byla po dobu 30 minut. Následně byla směs zcentrifugována při pokojové teplotě po dobu 5 minut a 12 000 rmp. Supernatant byl opět odstraněn a ke vzorku se přidalo 500 µl 75 % etanolu. Směs se opět inkubovala za stálého míchání při teplotě 15-30 °C, ale jen po dobu 20 minut. Poté opět následovala centrifugace při pokojové teplotě po dobu 5 minut a 12 000 rmp. Po centrifugaci se odsál supernatant, zkumavky se otočily dnem vzhůru a pelet se nechal sušit na stole po dobu 10 minut.

Po 10 minutách se pelet rozmíchal s 200 µl TE pufru a byl následně vložen na 10 minut do vodní lázně, která měla 55 °C. Poté se vzorek centrifugoval při 2-8 °C po dobu 10 minut a 12 000 rmp, aby došlo k oddělení nerozpustných částic, které mohl vzorek stále obsahovat. Po centrifugaci se vodná část, obsahující DNA, přenesla do čistých mikrozkumavek.

4.3.4. PCR

Pracovní roztoky

Mastermix

Na přípravu tohoto mastermixu se smíchaly složky uvedené v tabulce:

Složka	Pipetované množství na 2 reakce
Power Sybr Green Master Mix	10 µl
Forward primer PA2 6 µM	2 µl
Reverse primer PA2 6 µM	2 µl

Postup

Vzorky se pipetovaly v dubletu. Počet vzorků krát dva, k tomu pozitivní a negativní kontrola dávaly dohromady počet reakcí. Do počtu reakcí se počítala i pipetovací rezerva, což činilo 10 %.

Připravila se směs podle počtu reakcí smícháním složek pro mastermix. Matermix se pipetoval v množství 15,4 µl do zkumavek o objemu 200 µl. Následně se alikvoty krátce stočily. Po stočení se ke každému alikvotu přidalo 6,6 µl vzorku. Směs se špičkou zamíchala a pipetovala se dvakrát 10 µl do PCR stripu. Po napipetování všech vzorků se PCR stripy stočily a vložily do destičky. Prázdná místa v destičce byla zaplněna slepými stripy. Destička se vložila do přístroje a nastavil se programu.

Nastavení PCR programu:

Teplota	Čas
50°C	2 min
95°C	5 min
95°C	10 s
62°C	1 min

40 cyklů

4.3.5. Příprava kalibrační křivky

Pro porovnání výsledků bylo nutné si vytvořit kalibrační křivku.

Zásobní roztoky

<u>TSB médium</u>

30 g média bylo rozpuštěno v 1 l destilované vody. Po důkladném promíchání bylo médium autoklávováno při 121 °C po dobu 15 minut.

Postup

Zaočkovala se kultura Pseudomonas aeruginosa den předem na pevné médium TSA a kultivovala se v inkubátoru při 37 °C. Druhý den se narostlé Pseudomonády resuspendovaly v TSB médiu na OD 1 McF. 1,33 ml této suspenze se zaočkovalo do 6,66 ml TSB. Tímto způsobem byly zaočkovány 3 zkumavky, které se inkubovaly na třepačce při 37 °C a 150 rpm.

Odběry se prováděly v časech 150´, 210´, 420´ a 480´, respektive při 1,7; 2,8; 4,8; 5,2 McF. 2 ml zvortexované kultury se odebralo do 2 ml zkumavky, stočilo se to při 10000 rpm po dobu 1 minuty. Odebral se supernatant a buňky se zmrazily na -20 °C. V ostatních časech se odebíralo pouze po 1 ml média.

V odběrových časech probíhalo také stanovení bakteriálního počtu pomocí výsevové metody na živný agar. Odebralo se 25 µl zvortexované kultury a v desítkovém ředění s TSB médiem nebo peptonovou vodou se nanášela na cetrimidový agar.

4.3.5.1. Izolace DNA z bakterií

Pracovní roztok

<u>Lyzační roztok</u>

10 ml 1M Tris a 4 ml 0,25 M EDTA bylo doplněno deionizovanou vodou do objemu 1000 ml. Roztok se autoklávoval při 121 °C po dobu 20 min. Uchovával se při laboratorní teplotě.

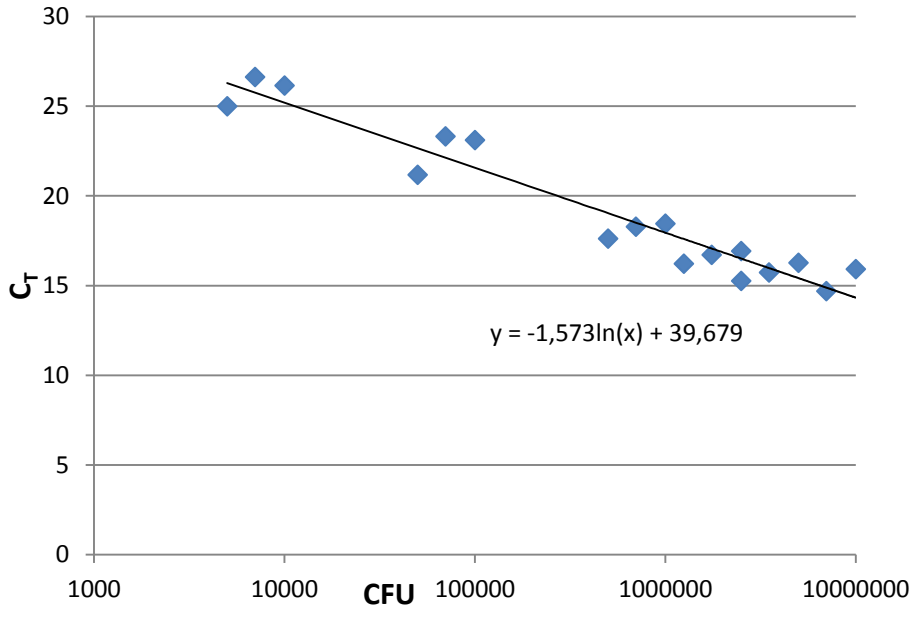
Pro práci s tímto roztokem se roztok zředil destilovanou vodou v poměru 1:9 (1 ml TE pufru:9 ml vody). Před použitím byl přidán lysozym (3 mg/ml).

Postup

K zmraženému peletu bylo přidáno 200 µl lyzačního roztoku (1x TE pufr s 3 mg/ml lysozymem), to jsme resuspendovali a následně inkubovali při 37 °C 1 hodinu. Poté bylo přidáno 500 µl TRIzolu a bylo to izolováno jako homogenát savčí tkáně.

4.3.5.2. Kalibrační křivka

Izolovaná DNA se rozředila na roztoky o koncentraci 100%, 50%, 25%, 10% a 1%, aby vytvořila kalibrační řadu. Toto bylo provedeno třikrát v nezávislých opakováních. Odečet koncentrační řady na živném agaru probíhal po 24 hodinové inkubaci v termostatu. Nárůst *Pseudomonas aeruginosa* byl sledován na cetrimidovém agaru, který je pro tento kmen selektivní. Vzorek byl pipetován devětkrát od 100% koncentrace desítkovým ředěním po 10^{-8} . Odečítal se počet bakterií v ředění, kde se dalo možná co nejpřesněji spočítat jejich množství. Spolu s odběrem bakterií pro izolaci DNA byl proveden i výsev na agar pro zjištění colony forming unit (CFU). Pro jeden čas odběru jsme získali výsledky z kultivace i real-time PCR. Zanesením hodnot PCR a kultivace do grafu nám vznikla kalibrační křivka, jejímž výsledkem byla rovnice pro přepočet tresholdcycle (C_T) z PCR na hodnotu CFU, která sloužila pro porovnání metod PCR a kultivace na živném agaru (Obr. 1). Výsledná rovnice byla y = -1,573ln(x) + 39,679.



Obrázek 4 Kalibrační křivka pro přepočet C_T na CFU. *V grafu jsou vyneseny naměřené a odvozené hodnoty CFU v měřítku přirozeného logaritmu oproti naměřeným hodnotám C_T. CFU – colony forming unit, C_T – treshold cycle*

5. VÝSLEDKY

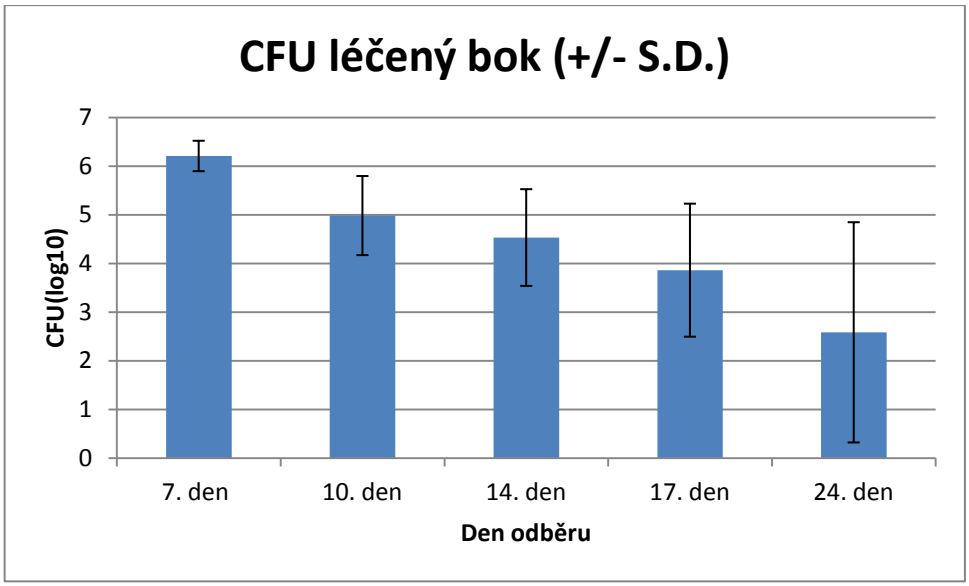
5.2. Odečet kultivace na živném agaru

. Pro každé zvíře je znázorněn graf (Obr. 7-16), který vystihuje zastoupení druhu Pseudomonas aeruginosa v průběhu hojení rány během 27 dní. Pro lepší porovnání s výsledky PCR bylo na grafech zvoleno logaritmické měřítko.

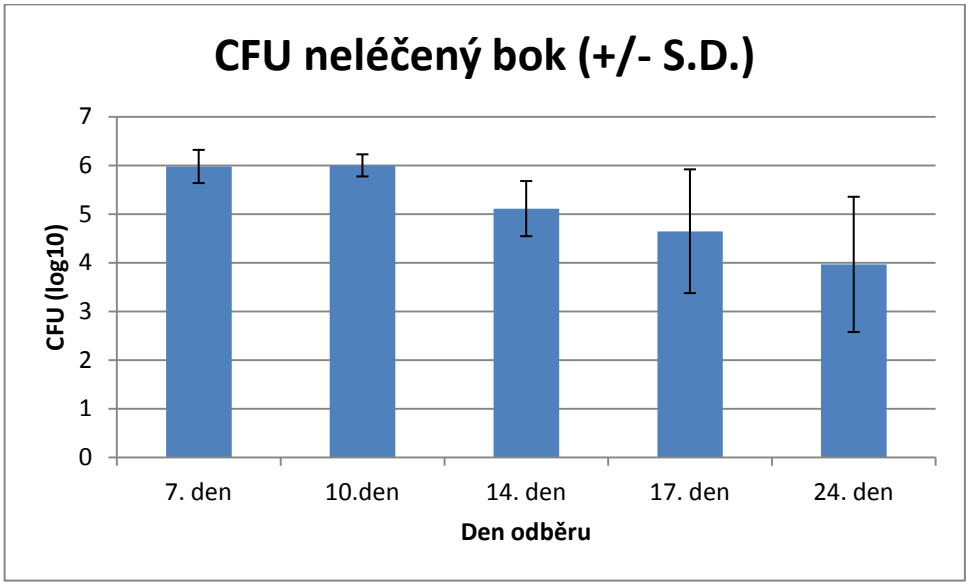
Na všech obrázcích (Obr. 7-16) můžeme vidět klesající tendenci zastoupení bakterie, kdy je vždy patrný rozdíl mezi prvním a posledním dnem odběru. Na obrázku 7 je vidět, že počet bakterií kolísá, ale k významnému poklesu nedocházelo. Pravidelný úbytek kmene Pseudomonas aeruginosa je vidět na obrázku číslo 10, kde dochází k poklesu jak bakterií v ráně léčené, tak i neléčené. Na ostatních obrázcích můžeme vidět pokles bakterií, který je narušen občasným vzrůstem hodnot během 1 nebo 2 odběrů mezi 1. a 5. odběrem.

Rozdíl mezi léčenou a neléčenou ránou by měl být z obrázků patrný. U ran léčených byl podle očekávání pokles bakterií výraznější a rychlejší. Rozdíl mezi prvním a pátým odběrem v počtu bakterií je u ran léčených daleko výraznější, i když průběh všech grafů není ideální a některé hodnoty kolísají jako např. v obrázcích 7, 8 a 10. Ve výsledku se dá ale říci, že sestupná tendence zůstala zachována. P hodnota (p= 6,64E-06) z testu ANOVA u kultivační metody potvrzuje změnu v počtu bakterií v průběhu času. Z obrázku číslo 5 je zřejmé, že dochází k poklesu počtu bakterií u rány léčené.

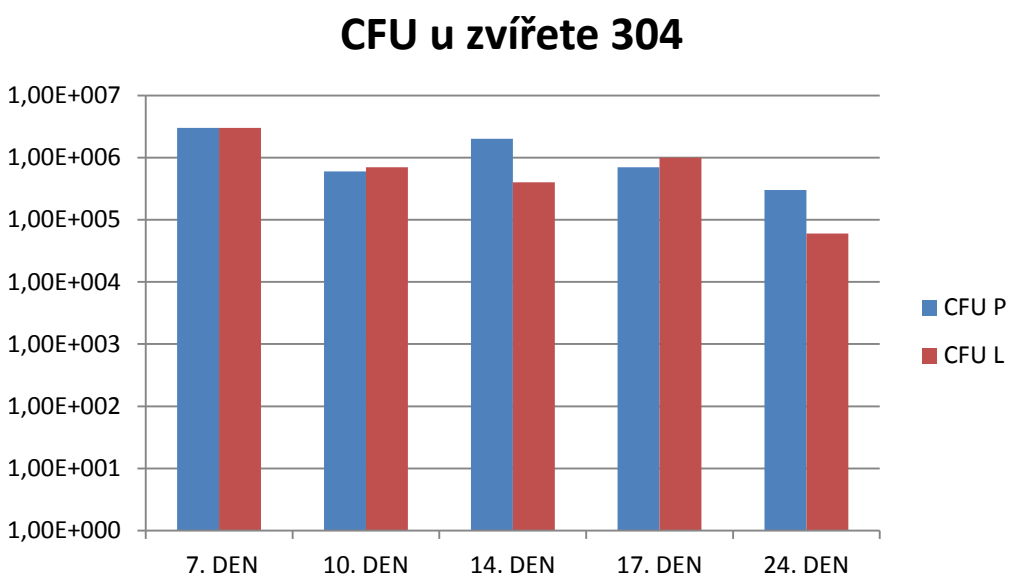
U neléčených ran není pokles bakterií tak výrazný, ale i zde je sestupná tendence. P hodnota (p= 1,19274E-05) z testu ANOVA u kultivační metody potvrzuje změnu v počtu bakterií v průběhu času. Z obrázku číslo 6 je zřejmé, že dochází k poklesu počtu bakterií u neléčené rány. Z obrázků 7-16 je patrné, že k poklesu bakterií docházelo, ale ne tak rychle jako u ran léčených. Počet bakterií u neléčených ran nekolísal tolik jako u ran léčených.



Obrázek 5. Počty bakterií v biopsiích léčených ran stanovených kultivační metodou. *Sloupce jsou průměry ± směrodatné odchylky (n=10) na logaritmické škále.*

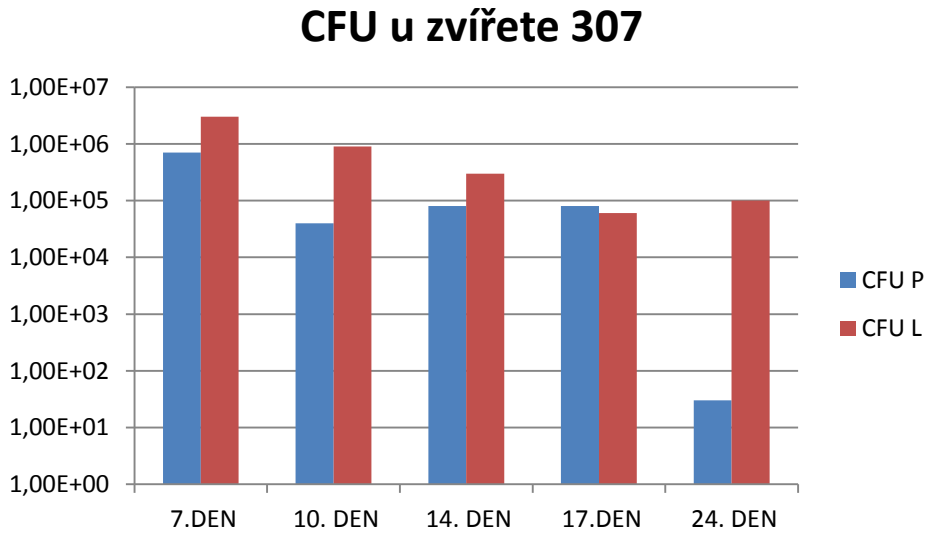


Obrázek 6. Počty bakterií v biopsiích neléčených ran stanovených kultivační metodou. *Sloupce jsou průměry ± směrodatné odchylky (n=10) na logaritmické škále.*



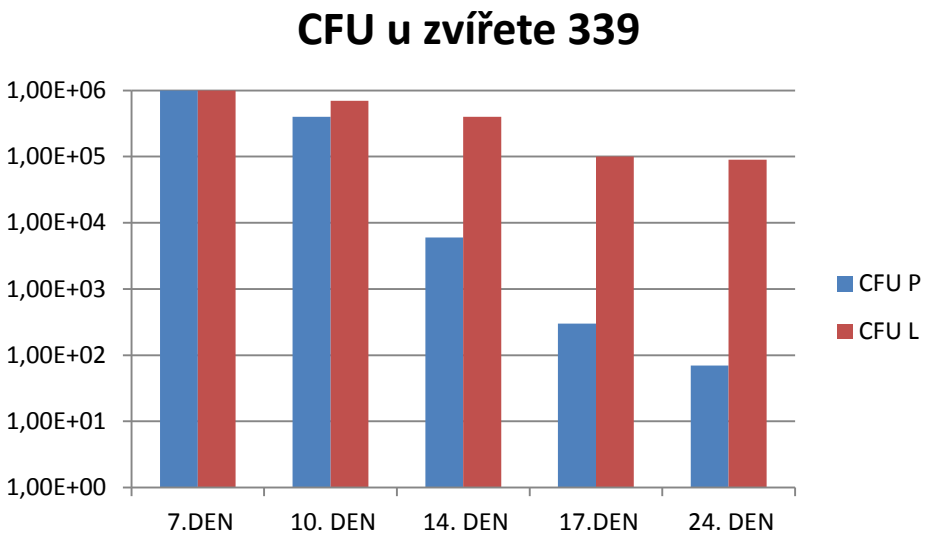
Obrázek 7 CFU u zvířete 304

V grafu jsou zobrazeny hodnoty CFU, kdy CFU P vyjadřuje hodnoty průběhu hojení rány na pravém boku zvířete, která byla léčená, a CFU L hodnoty z levého boku, který byl neléčený. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



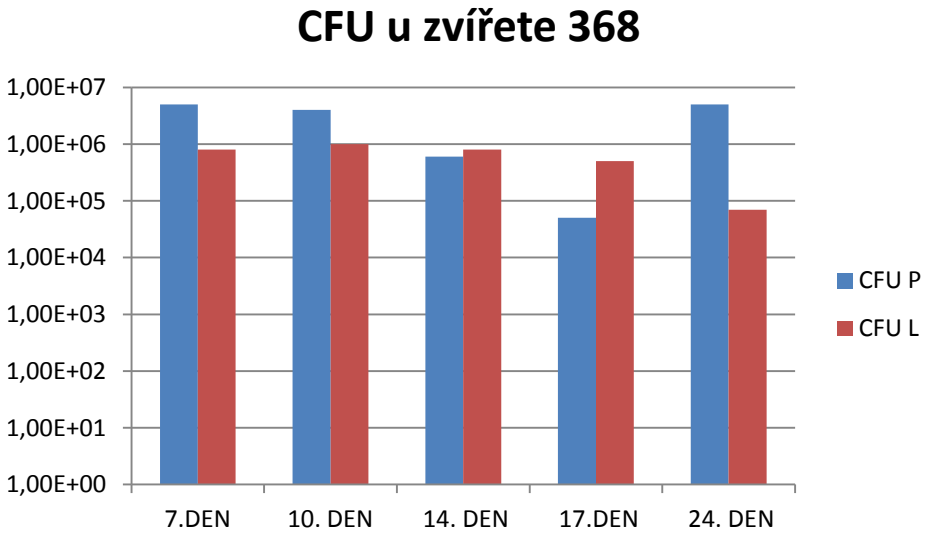
Obrázek 8 CFU u zvířete 307

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



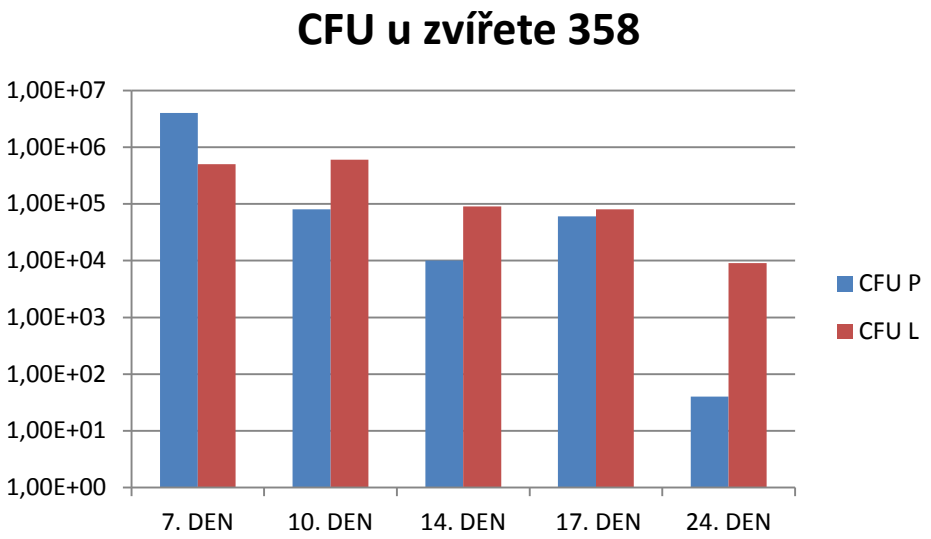
Obrázek 9 CFU u zvířete 339

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



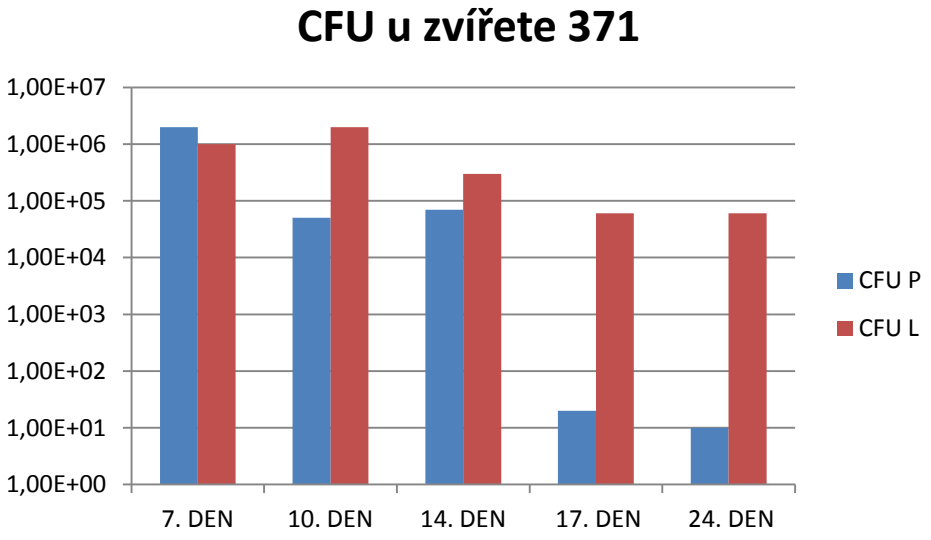
Obrázek 10 CFU u zvířete 368

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku



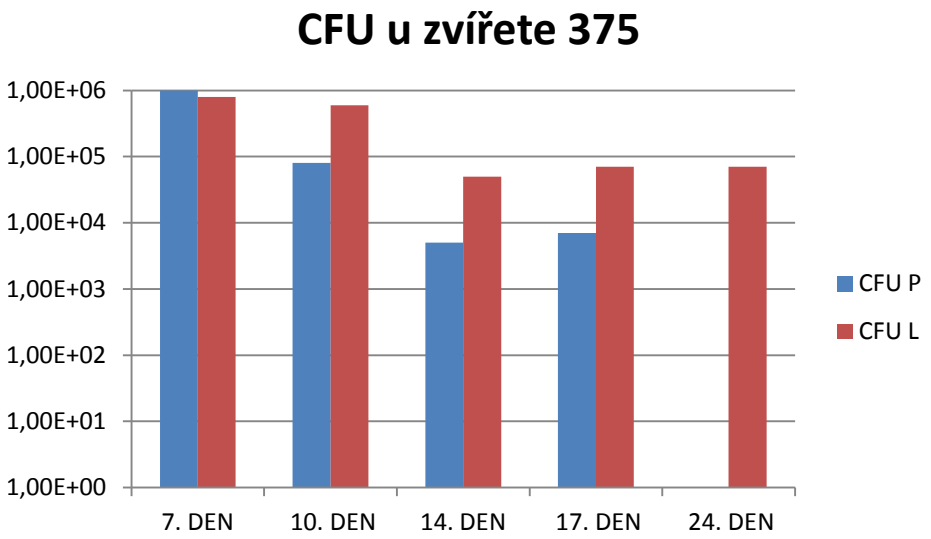
Obrázek 11 CFU u zvířete 358

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku



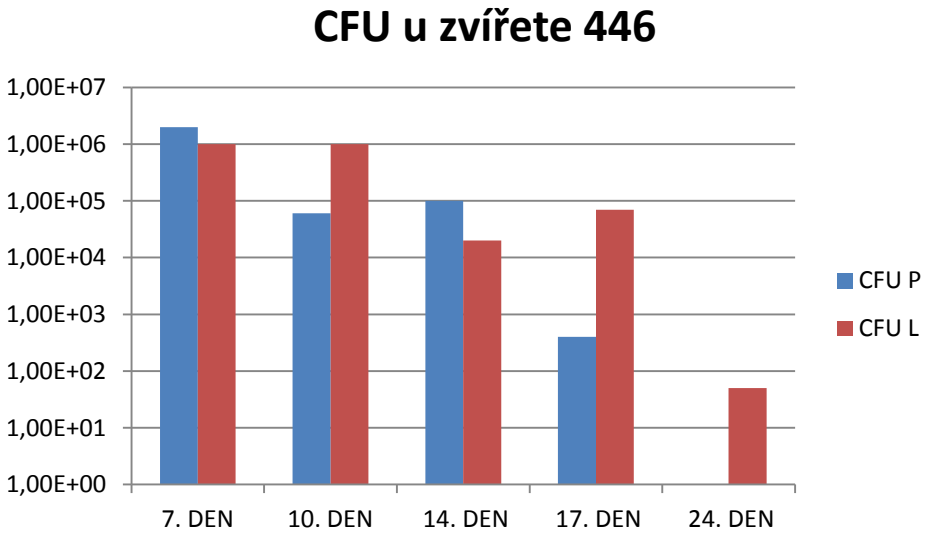
Obrázek 12 CFU u zvířete 371

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



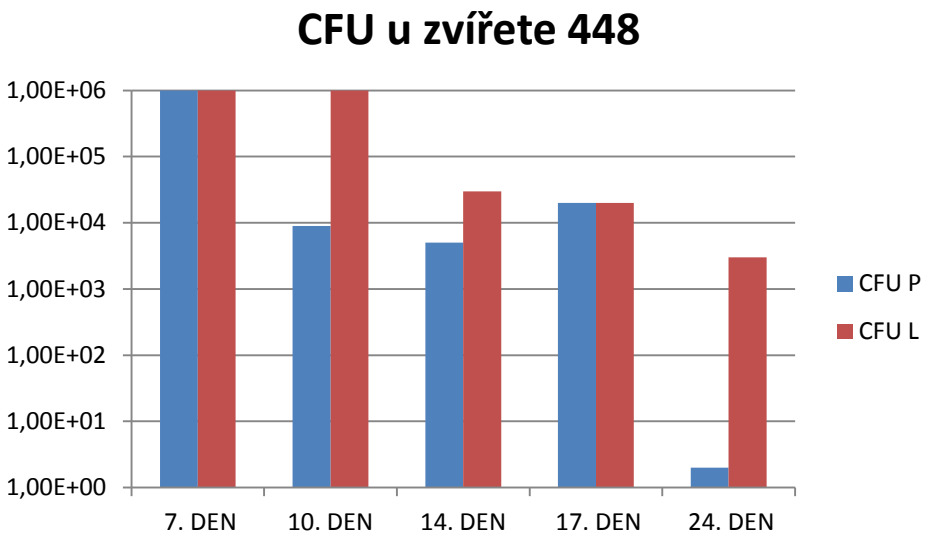
Obrázek 13 CFU u zvířete 375

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



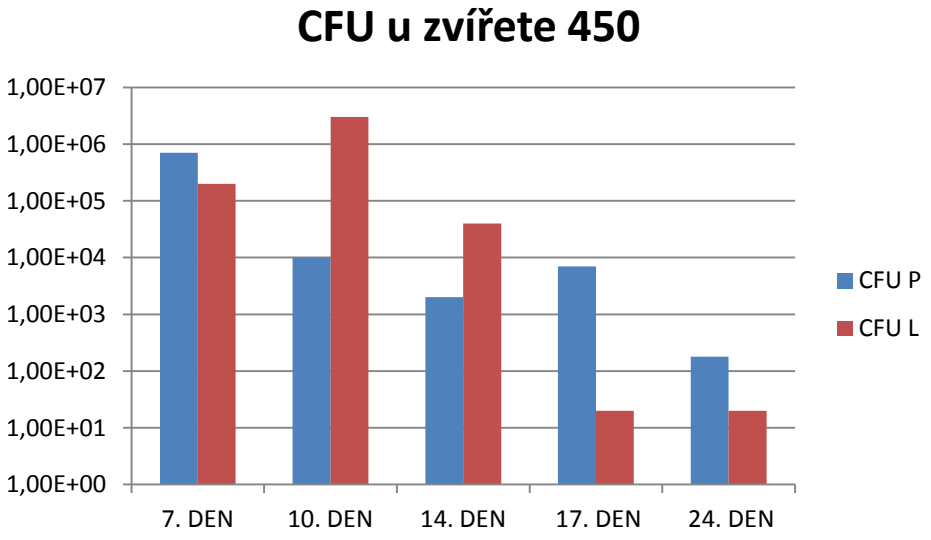
Obrázek 14 CFU u zvířete 446

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



Obrázek 15 CFU u zvířete 448

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.



Obrázek 16 CFU u zvířete 450

CFU P – rána léčená, CFU L - rána neléčená. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU v logaritmickém měřítku.

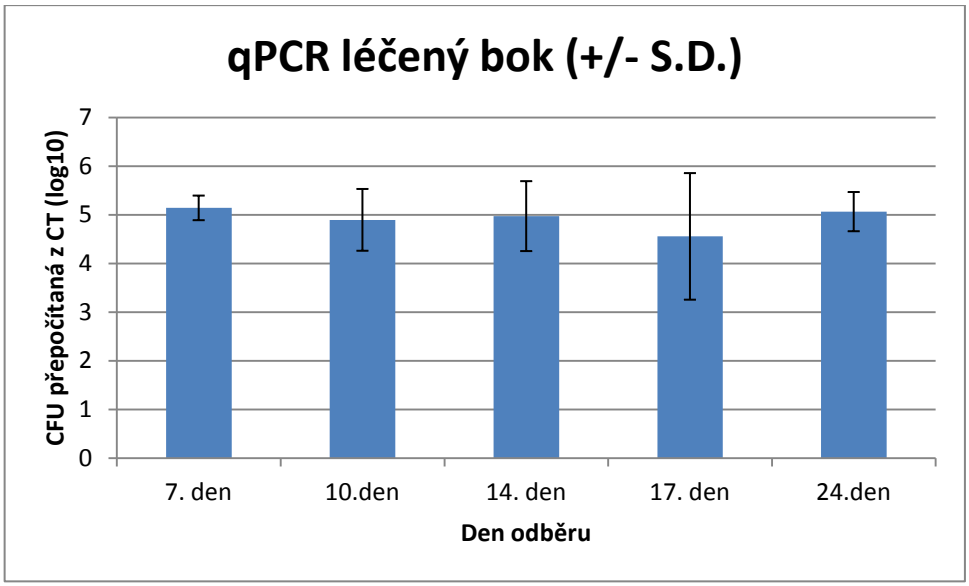
5.3. Vyhodnocení real-time PCR

Izolovaná DNA z biopsie byla zpracována pro real-time PCR. Výsledkem real-time PCR jsou hodnoty C_T. Pro porovnání výsledků s výsledky kultivace byly hodnoty C_T pomocí rovnice kalibrační křivky přepočítány na CFU pro danou hodnotu C_T. Rovnice pro přepočet C_T na CFU byla y= - 1,573ln(x)+39,679, kdy za y se dosadila hodnota daného C_T a výsledkem byla hodnota CFU.

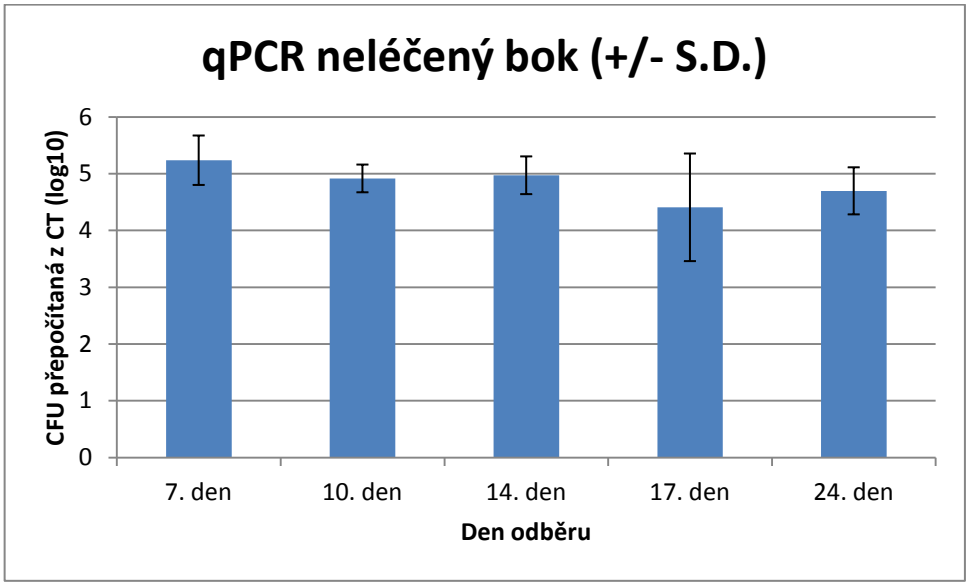
Pro porovnatelnost výsledků bylo zvoleno logaritmické měřítko pro hodnoty CFU vypočítané z C_T. Na obrázcích 19-28 bychom mohli předpokládat stejnou klesající tendenci jako u výsledků kultivace, ale takový zřetelný pokles tu vidět není. Hodnoty CFU se zde drží velmi blízko hodnotám 1. dne. Pokles je zde jen velmi malý a kolísá ve více hodnotách než výsledky kultivace. Rozdíl mezi počtem bakterií první a poslední den odběru není tak výrazný jako u výsledků kultivace. Na některých obrázcích jako jsou obrázky 19, 20, 23, 25 a 27 můžeme vidět, že k žádnému výraznému poklesu nedošlo a hodnoty jsou téměř totožné.

U ran léčených není pokles počtu bakterií v průběhu hojení téměř žádný. P hodnota (p= 0,468161137) z testu ANOVA u real-time PCR nepotvrzuje změnu počtu bakterií v průběhu času. Z obrázku číslo 17 můžeme vidět, že k žádnému poklesu bakterií v průběhu hojení nedocházelo.

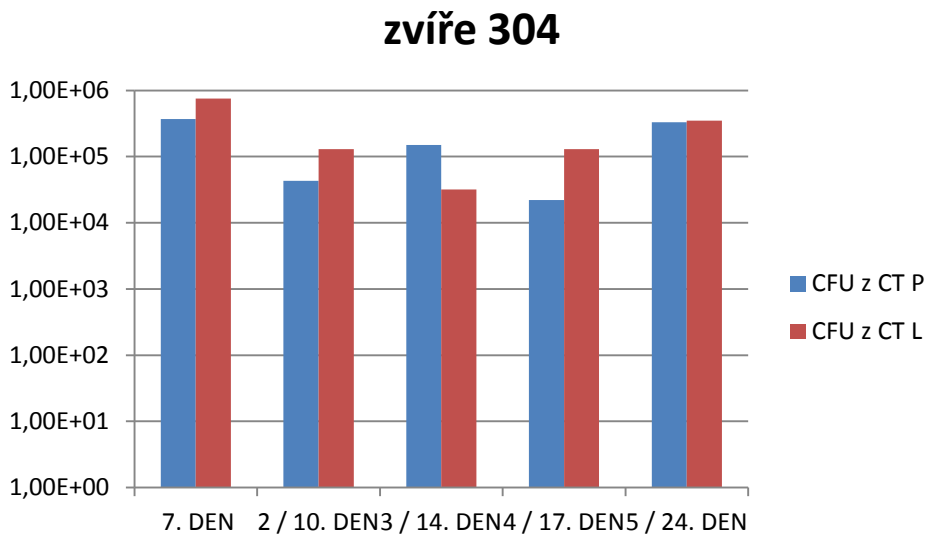
U neléčených ran k mírnému poklesu v průběhu hojení ran dochází, ale pokles není tak výrazný jako u kultivace. P hodnota (0,016520941) z testu ANOVA potvrzuje změnu v počtu bakterií v průběhu času, ale z obrázku číslo 18 můžeme vidět, že pokles vůbec není tak výrazný a v porovnání s kultivací není tak přesvědčivý.



Obrázek 17 Počty bakterií v biopsiích léčených ran stanovených metodou real-time PCR. *Sloupce jsou průměry ± směrodatné odchylky (n=10) na logaritmické škále.*

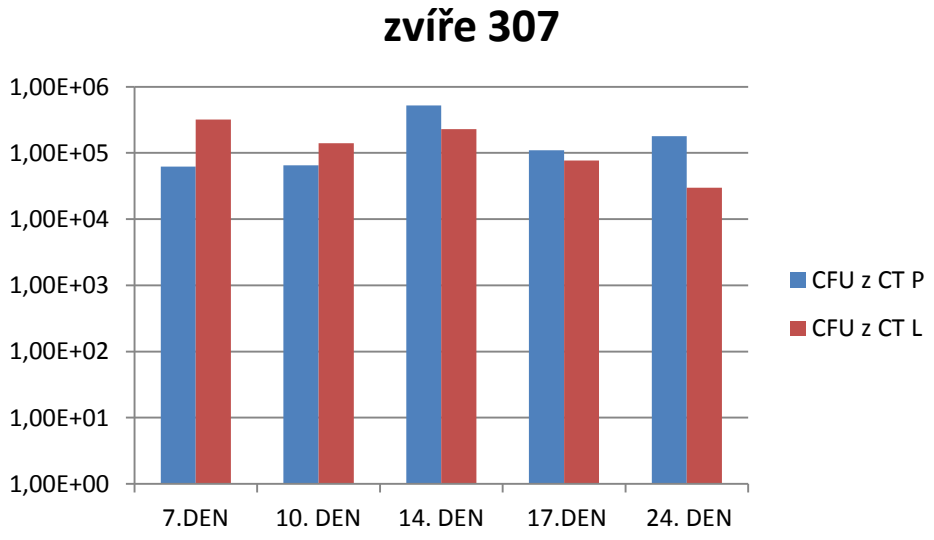


Obrázek 18. Počty bakterií v biopsiích neléčených ran stanovených metodou real-time PCR. *Sloupce jsou průměry ± směrodatné odchylky (n=10) na logaritmické škále.*



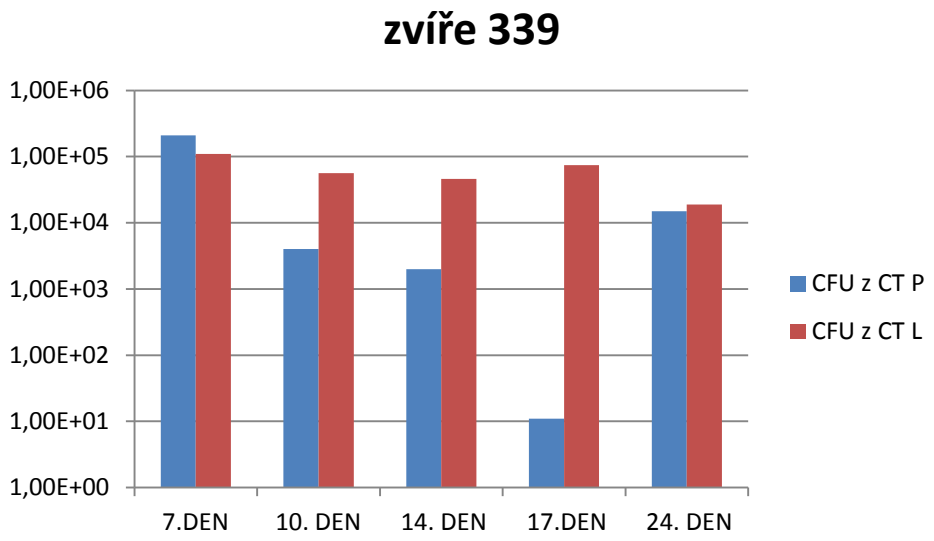
Obrázek 19 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 304

Tento a následující grafy ukazují hodnoty CFU, které byly vypočítány dosazením hodnoty C_T do kalibrační křivky. CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Pravý bok byl léčený a levý bok byl neléčený. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



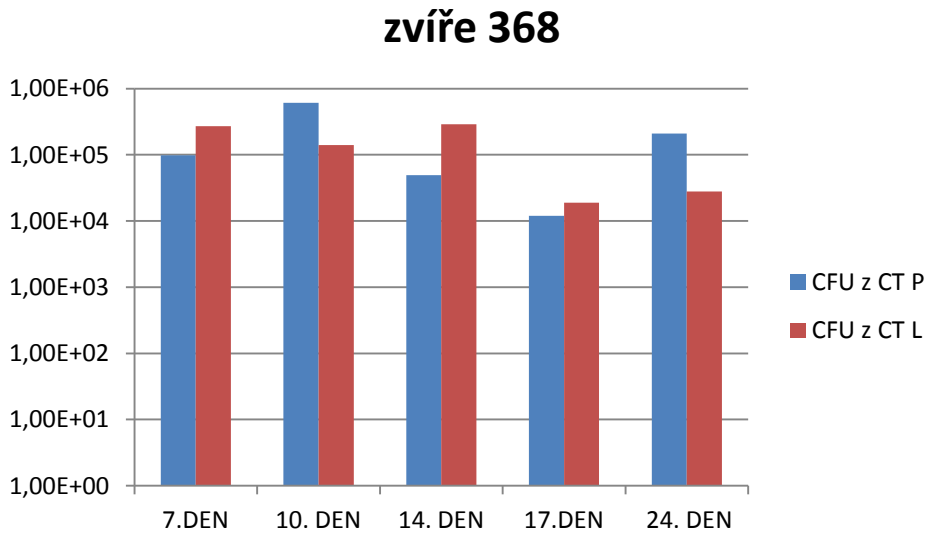
Obrázek 20 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 307

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku



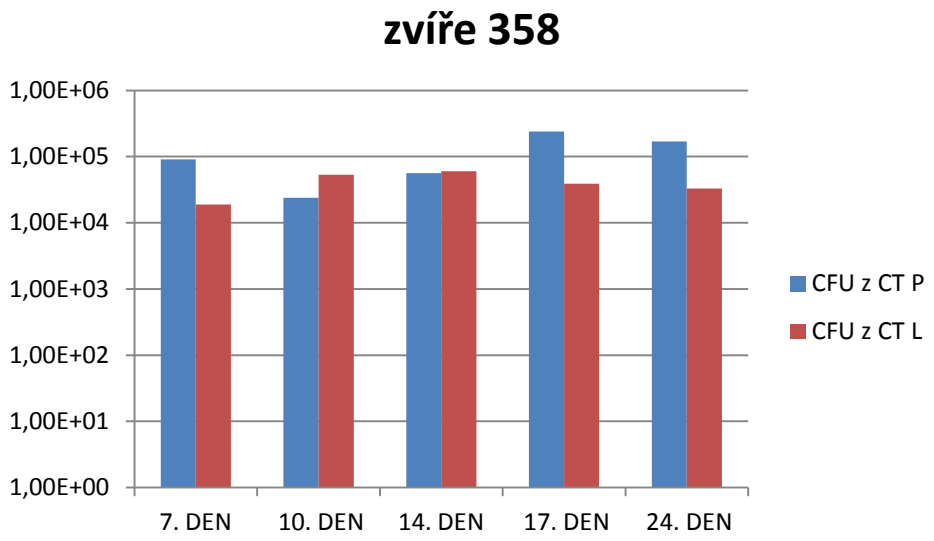
Obrázek 21 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 339

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



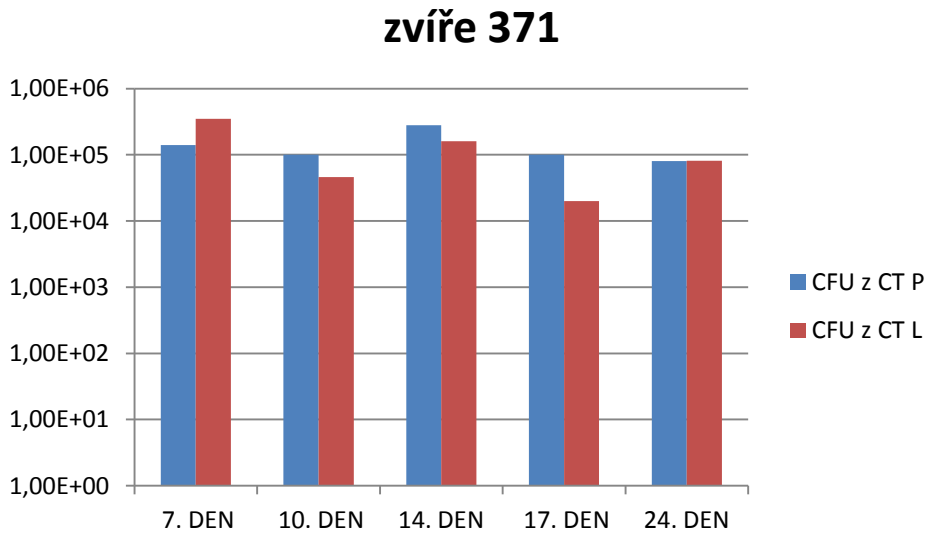
Obrázek 22 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 368

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



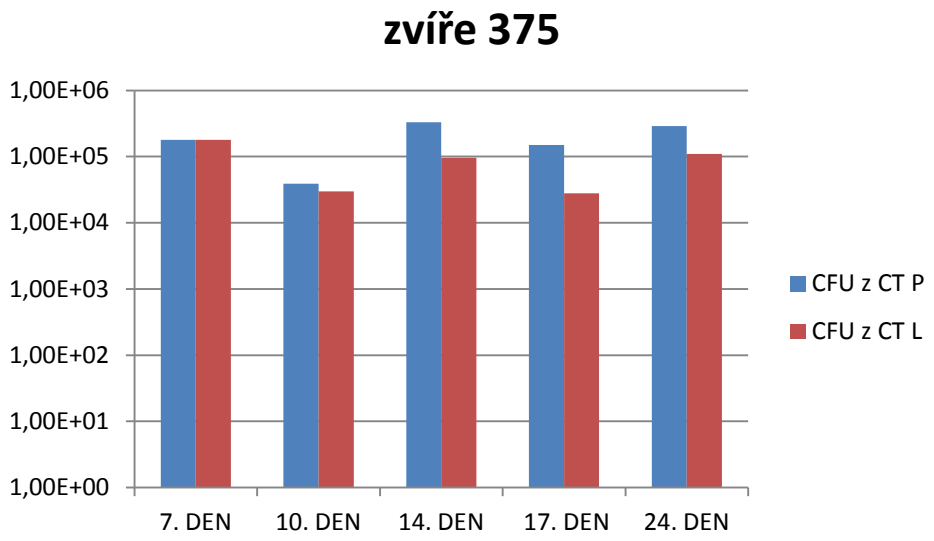
Obrázek 23 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 358

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



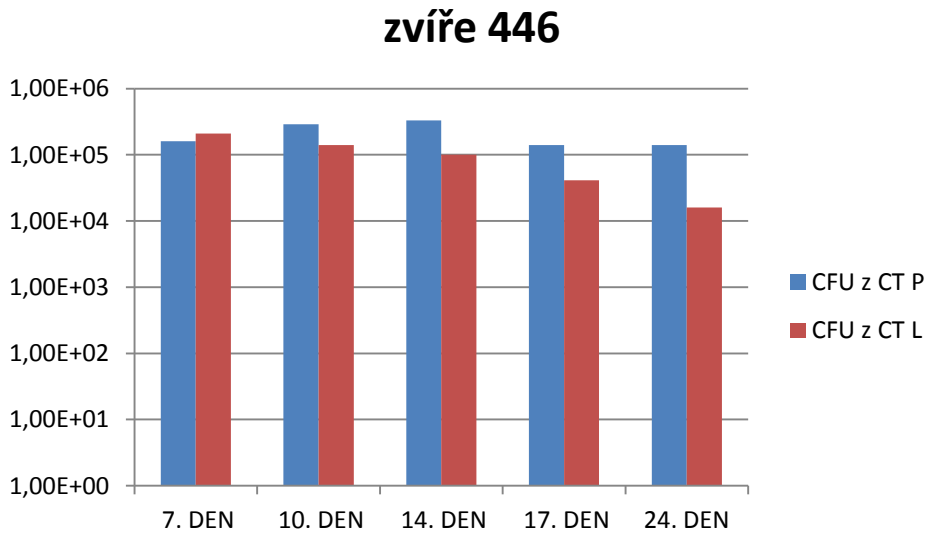
Obrázek 24 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 371

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



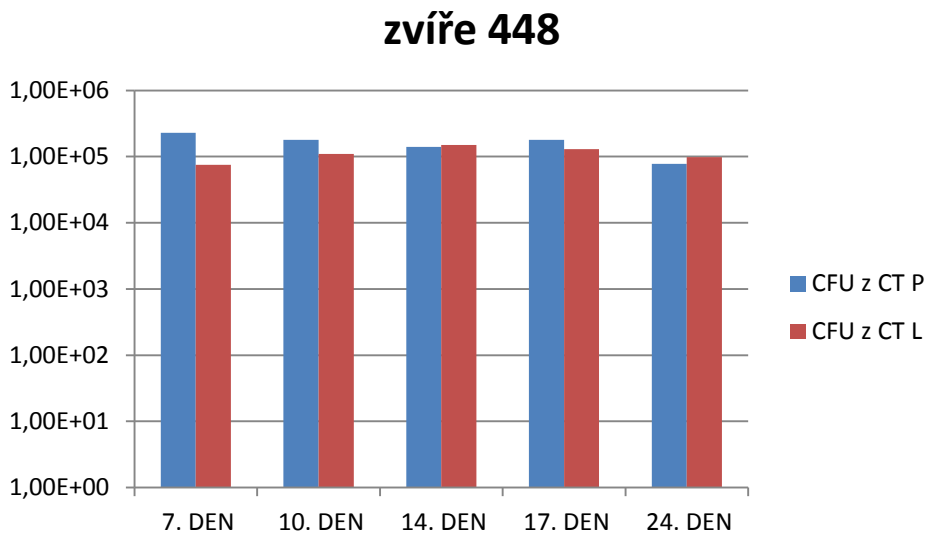
Obrázek 25 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 375

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



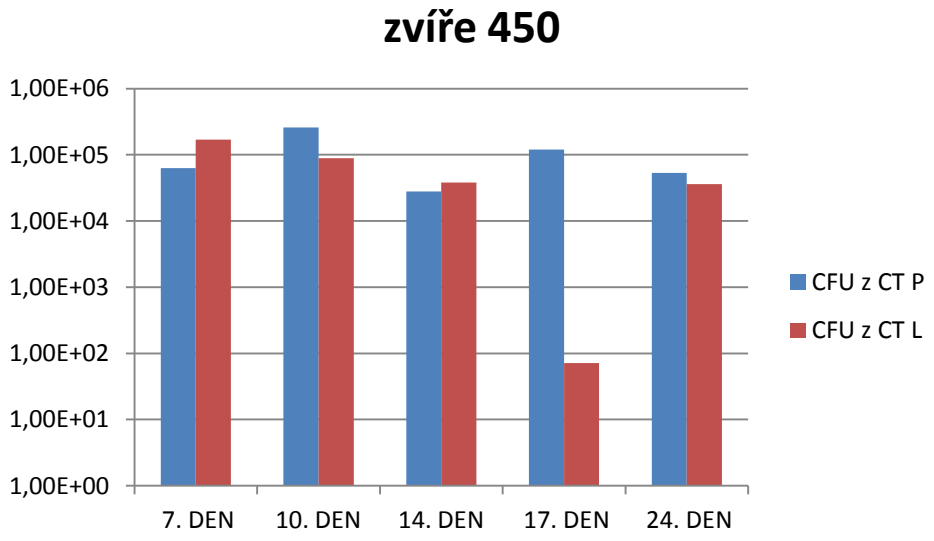
Obrázek 26 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 446

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



Obrázek 27 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 448

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.



Obrázek 28 Vypočítaná hodnota CFU z hodnoty C_T u zvířete 450

CFU z CT P vyjadřuje CFU získanou přepočtem hodnoty C_T z pravého boku zvířete a CFU z CT L z levého boku zvířete. Osa x popisuje den odběru tkáňové biopsie, na ose y jsou hodnoty CFU přepočítané z C_T v logaritmickém měřítku.

6. DISKUZE

Chronické rány a jejich léčba jsou jednou z mnoha oblastí, na kterou je zaměřován vědecký zájem. K vyšetření se obvykle používá stěr z rány, který se kultivuje. Tato technika není vhodná pro vysoce kontaminované otevřené chronické rány, protože interpretace výsledků je obtížná, stejně jako kultivace anaerobních druhů, které se v ráně vyskytují. Pro infekční rány s bakteriálním počtem vyšším $1x10^5$ CFU na gram tkáně je vhodnější použít tkáňovou biopsii. (Nakagami a kol. 2008)

V této diplomové práci jsme porovnávali metodu kultivace s real-time PCR. Testovaným druhem byla *Pseudomonas aeruginosa* izolovaná z uměle vytvořené chronické rány. Z rány byly odebírány tkáňové biopsie, které se následně zpracovávaly pro stanovení CFU a zároveň kvantifikaci pomocí real-time PCR.

Rhoads a kol. (2012) uvádí, že kultivace a molekulární testování bakterií v ráně produkují odlišné a často rozporuplné výsledky, protože výsledky molekulárních metod jsou citlivější než kultivace. Toto tvrzení se ukázalo být pravdivé i v naší práci. Podle očekávání docházelo k poklesu počtu bakterií v průběhu hojení rány během 27 dní. Z kultivace bylo patrné, že u léčených ran docházelo k poklesu výrazněji a rychleji v porovnání s ranami neléčenými. Oproti tomu u výsledků real-time PCR není pokles tak zřetelný jako u kultivace. Hodnoty v průběhu hojení se držely velmi blízko hodnotám prvního dne odběru. Vysvětlením této nesrovnalosti může být, že kultivace zachytí pouze živé mikroorganismy, kdežto real-time PCR zachytí DNA i z rozpadlého, mrtvého mikroorganismu, nebo DNA cíleně vyráběnou jako součást biofilmu. Nocker a kol. (2008) uvádí, že pro techniky založené na DNA je překážkou to, že DNA může být velmi stabilní a může přetrvávat delší dobu (dny až týdny) po smrti buněk. U experimentální rány dochází k odhojení biofilmu a jejímu zahojení. U pacientů to může být jiná situace. Je zde předpoklad, že odhady budou přesnější, protože u pacientů nebude taková masa „mrtvého“ biofilmu.

Hill a kol. (2003) uvádí, že molekulární techniky mohou detekovat přítomnost bakterií, i když kultivace vyšla negativní. Toto se stalo i v našem případě, kdy byla kultivace dvakrát při posledním odběru negativní, přesto real-time PCR detekovala přítomnost bakterií, dokonce na stejné úrovni jako první den odběru. Vysvětlením může být buď záchyt DNA z mrtvých buněk, nebo že hladina bakterií je tak nízká, že už není

kultivačně zachytitelná. Ale vzhledem k tomu, že hodnota je stejně vysoká, jako první den odběru je pravděpodobnější, že došlo k záchytu DNA z mrtvých buněk.

Zdá se, že záchyt DNA z mrtvých buněk zkresluje výsledky real-time PCR. Řešením by mohlo být použití propidium monoazidu. Nocker a kol. (2008) prokázal, že propidium monoazid je užitečný pro rozlišení živých a mrtvých buněk v kombinaci s real-time PCR. Propidium monoazid vstupuje do buněk porušenou membránou, kde se s vysokou afinitou váže na DNA. Propidium monoazid má světelně citlivou azidovou skupinu, která způsobí kovalentní zesítění organických skupin v jeho blízkosti při vystavení světlu. Kovalentní vazby barviva silně inhibují PCR amplifikaci. V důsledku toho jsou C_T hodnoty pro real- time PCR výrazně vyšší. Úprava vzorku propidium monoazidem se ukazuje jako slibná metoda pro vyloučení mrtvých buněk, ale není zde alternativa pro určení aktivních buněk mikrobiální komunity. Neporušenost membrány není důkazem životaschopnosti buňky, protože i buňky s neporušenou membránou mohou být neaktivní. Nicméně omezení analýzy mrtvých buněk může být nevýhodou.

Molekulární metody mohou překonat některé kultivační nedostatky. Detekují anaeroby a bakterie bez ohledu na to, jak mohou, nebo nemohou růst v kultuře. U molekulárních metod je snadnější kvantifikace a na rozdíl od kultivace přítomnost antibiotik ve vzorku nezasahuje do citlivosti testu. Samotná kultivace neprezentuje skutečný rozsah bakteriální rozmanitosti v rámci chronické rány. Komplexnější analýza je možná s použitím molekulárních technik. (Hill a kol. 2003, Rhoads a kol. 2012)

Kirketerp-Moller a kol. (2008) uvádí, že bakteriální profilování chronické infikované rány pomocí kultivace může podceňovat přítomnost významných patogenů, jako je Pseudomonas aeruginosa. Je známo, že bakterie v biofilmu jsou obtížně kultivovatelné. Kultivace z biopsie neodhalí přítomnost bakteriálního biofilmu. Rüger a kol. (2014) uvádí, že má Pseudomonas aeruginosa zlepšený růst ve smíšených kulturách. Její specifická růstová rychlost ve smíšených kulturách je vyšší ve srovnání s čistými kulturami. Toto je pravděpodobně způsobeno neznámými mezidruhovými účinky. Pseudomonas aeruginosa jednoznačně dominuje ve smíšených kulturách.

7. ZÁVĚR

Výsledky real-time PCR se s výsledky kultivace neztotožňovaly. Kultivačně byla vidět klesající tendence počtu bakterií v průběhu hojení u rány léčené i neléčené. Rozdíl mezi ránou léčenou a neléčenou byl znatelný. V ráně léčené docházelo k výraznějšímu a rychlejšímu poklesu bakterií.

Hodnoty počtu bakterií určených pomocí real-time PCR neměly v čase klesající tendenci jako hodnoty kultivace, ale odpovídaly hodnotám 1. odběru po celý průběh hojení. Rozdíl v počtu bakterií mezi ránou léčenou a neléčenou byl pomocí detekce real-time PCR nepatrný.

Pro kvantifikaci bakteriální nálože *Pseudomonas aeruginosa* v průběhu hojení rány se v našem případě stala lepší metoda kultivace, která lépe ukazovala pokles zastoupení v ráně v průběhu hojení a rozdíl mezi léčenou a neléčenou kontrolou.

Seznam použité literatury:

ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 80-902-9062-0.

ALLISON, D.G. a MATTHEWS, M.J.. 1992. Effect of polysaccharide interactions on antibiotic susceptibility of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Applied Bacteriology*. **73**(6): 484-488. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb05009.x.

BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, c2009, xxv, 651 s. ISBN 978-807-2626-441.

BESSA, L. J. a kol. 2015. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal*. **12**(1): 47-52. DOI: 10.1111/iwj.12049. ISSN 17424801. [cit. 2015-04-20]. Dostupné také z: http://dx.doi.org/10.1111/iwj.12049

BJARNSHOLT, T. a kol. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair and Regeneration*. 2008, vol. 16, issue 1, s. 2-10. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x.[cit. 2015-04-05] Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x

BJARNSHOLT, Thomas. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Published by Blackwell Publishing Ltd.* 2013, vol. 121, 121 (Suppl. 136):,s. 1-58. DOI: 10.1111/apm.12099. [cit. 2015-04-15] Dostupné z: http://www.libgen.org/scimag/index.php?s=The%20role%20bacterial%20biofilms%20in%20chronic%20infections

BONETTA, L. Prime time for real-time PCR. 2005. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: http://www.nature.com/nmeth/journal/v2/n4/full/nmeth0405-305.html

BOSANQUET, David C. a Keith G. HARDING. Wound duration and healing rates: Cause or effect?. *Wound Repair and Regeneration*. 2014, vol. 22, issue 2, s. 143-150. DOI: 10.1111/wrr.12149. [cit. 2015- 04-08] Dostupné z:http://www.libgen.org/scimag/index.php?s=wound%20duration%20and%20healing%20rates

ESPY, M. J.a kol. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006-01-17, vol. 19, issue 1, s. 165-256. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165-256.2006. [cit. 2015-04-12] Dostupné z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006

GAN, Stephanie D a Kruti R PATEL. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, vol. 133, issue 9, e12-. DOI: 10.1038/jid.2013.287. [cit. 2015-03-20] Dostupné z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jid.2013.287

GARIBYAN, Lilit a Nidhi AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, vol. 133, issue 3, e6-. DOI: 10.1038/jid.2013.1. [cit. 2015-03-22]. Dostupné z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jid.2013.1

GUO, S. a L. A. DIPIETRO. Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. 2010-02-11, vol. 89, issue 3, s. 219-229. DOI: 10.1177/0022034509359125. [cit. 2015-04-16]Dostupné z: http://jdr.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0022034509359125

GEETA SUMBALI, R S Mehrotra. *Principles of microbiology*. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 2009. ISBN 978-007-0141-209.

FAZLI, M. a kol. Nonrandom Distribution of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in Chronic Wounds. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009-11-30, vol. 47, issue 12, s. 4084-4089. DOI: 10.1128/JCM.01395-09. [cit. 2015-04-15]Dostupné z: http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01395-09

HILL, K.E.a kol. Molecular analysis of the microflora in chronic venous leg ulceration. *Journal of Medical Microbiology*. 2003, vol. 52, issue 4, s. 365-369. DOI: 10.1099/jmm.0.05030-0. [cit. 2015-04-02]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676877

HU, Yanmin a kol. Combinations of β-Lactam or Aminoglycoside Antibiotics with Plectasin Are Synergistic against Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *PLOS ONE*. 2015-2-18, vol. 10, issue 2, e0117664-.DOI: 10.1371/journal.pone.0117664. [cit. 2015-04-01] Dostupné z: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117664

INOSHIMA, I. a kol. (2011). *Staphylococcus aureus* vytvářející póry Toxin podvrací aktivita ADAM10 k Příčina Smrtonosná infekci. *Nature Medicine* , *17* (10), 1310-1314. doi: 10,1038 / nm.2451

JANÍKOVÁ, Eva a Renáta ZELENÍKOVÁ. *Ošetřovatelská péče v chirurgii: pro bakalářské a magisterské studium*. 1. vyd. Praha: Grada, 2013, 249 s. ISBN 978-802-4744-124.

KIRKETERP-MOLLER, K. a kol. Distribution, Organization, and Ecology of Bacteria in Chronic Wounds.*Journal of Clinical Microbiology*. 2008-08-04, vol. 46, issue 8, s. 2717-2722. DOI: 10.1128/JCM.00501-08. [cit. 2015-04-08] Dostupné z:http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00501-08

KONEMAN Elmer W, WINN, Washington C. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, c2006, xxxi, 1535, 30 p., [79] leaves of plates. ISBN 07-817-3014-7.

KURCEK, A. Real-tima PCR. 2011. [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/real-time-pcr

LISTER, P. D. a kol. Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009-10-12, vol. 22, issue 4, s. 582-610. DOI: 10.1128/CMR.00040-09. [cit. 2015-04-05] Dostupné z: http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00040-09

LOBMANN, R. a kol. 2002. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*. **45**(7): 1011-1016. DOI: 10.1007/s00125-002-0868-8. ISSN 0012-186x. [cit. 2015-05-01]Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00125-002-0868-8

MAMA, M. a kol. Antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates from wound infection and their sensitivity to alternative topical agents at Jimma University Specialized Hospital, South-West Ethiopia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2014, vol. 13, issue 1, s. 14-. DOI: 10.1186/1476-0711-13-14. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: http://www.ann-clinmicrob.com/content/13/1/14

MATĚJKOVÁ, A. a BUREŠ, I. Chronické rány u geriatrických pacientů. *Medical tribune*. 2009, č. 30. [cit. 2015-04-27]Dostupné z:http://www.tribune.cz/clanek/15375-chronicke-rany-u-geriatrickych-pacientu

MIHAI a kol. Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. *Romanian journal of morphology and embryology RJME*. 2014, 55(4):1401–1408.[cit. 2015-05-01] Dostupné z: http://www.rjme.ro/RJME/resources/files/55041414011408

MOSSER, D. M. a EDWARDS,J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. **8**(12): 958-969. DOI: 10.1038/nri2448. ISSN 1474-1733. [cit. 2015-05-01]. Dostupné také z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri2448

NAKAGAMI, G. a kol. Detection of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing signals in an infected ischemic wound: An experimental study in rats. *Wound Repair and Regeneration*. 2008, vol. 16, issue 1, s. 30-36. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00329.x.[cit. 2015-05-01] Dostupné z:http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2007.00329.x

NOCKER, A. a kol. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, issue 16,

s. 5111-5117. DOI: 10.1128/aem.02987-06. [cit. 2015-05-01] Dostupné z: http://aem.asm.org/content/73/16/5111.full

PARK, J. E. a BARBUL, A. . Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*. 2004, **187**(5): S11-S16. DOI: 10.1016/S0002-9610(03)00296-4. ISSN 00029610. [cit. 2015-05-01] Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961003002964

PEJZNOCHOVÁ, Irena. *Lokální ošetřování ran a defektů na kůži*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 76 s. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4726-823.

RHOADS, D.D. a kol. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. *BMC Infectious Diseases*. 2012, vol. 12, issue 1, s. 321-. DOI: 10.1186/1471-2334-12-321. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/321

RÜGER, M. a kol. Species-specific viability analysis of Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia and Staphylococcus aureus in mixed culture by flow cytometry. *BMC Microbiology*. 2014, vol. 14, issue 1, s. 56-. DOI: 10.1186/1471-2180-14-56. [cit. 2015-05 01]. Dostupné z: http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/56

SELLNER ŠVESTKOVÁ, PH.D., MUDr. Sabina. Léčba nehojících se ran u geriatrických pacientů. *Zdravotnictví a medicína*. Praha: MF Medical, 2015, č. 3. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://zdravi.e15.cz/clanek/mlada-fronta-zdravotnicke-noviny-zdn/lecba-nehojicich-se-ran-u-geriatrickych-pacientu-478389

SERRA, R. a kol. Chronic wound infections: the role of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2015, vol. 13, issue 5, s. 605-613. DOI: 10.1586/14787210.2015.1023291.[cit. 2015-05.01] Dostupné z: http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/14787210.2015.1023291

SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014, 215 s., xxiv s. obr. příl. Sestra (Grada). ISBN 978-802-4747-712.

STEWART,P.S. Teoretické aspekty antibiotické difúze do mikrobiálních biofilmů.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy* . 1996; 40 (11): 2517-2522. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC163567/

STEWART, Philip S a J WILLIAM COSTERTON. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 2001, vol. 358, issue 9276, s. 135-138. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.[cit. 2015-05.01] Dostupné z:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673601053211

TRENGOVE, N. J.a kol. 1999. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair and Regeneration*. **7**(6): 442-452. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1999.00442.x. ISSN 1067-1927. [cit. 2015-05-01]. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1999.00442.x

VAN DER VELDEN, a kol. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. 2003, vol. 17, issue 6, s. 1013-1034. DOI: 10.1038/sj.leu.2402922. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.leu.2402922

VASANTHAKUMARI, R. *Practical microbiology*. New Delhi: BI publications Pvt Ltd, 2009. ISBN 978-81-7225-318-9.

WEINSTEIN, R. A. a kol. 2005. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases*. **41**(6): 848-854. DOI: 10.1086/432803. ISSN 1058-4838. [cit. 2015-05-01]. Dostupné také z: http://cid.oxfordjournals.org/content/41/6/848.long

YUAN, JoshuaS, a kol. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006, vol. 7, issue 1, s. 85-. DOI: 10.1186/1471-2105-7-85. [cit. 2015-05-01]. Dostupné z: http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85

ZOUROB, Mohammed, Souna ELWARY a Anthony TURNER. *Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors, and microsystems.* New York: Springer, c2008, xxxli, 970 p. ISBN 9780387751122-.